

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA DE POST GRADO

**Caracterización molecular de la enzima similar a
trombina del veneno de la serpiente *Bothrops barnetti*
y el rol de la N-glicosilación en su actividad enzimática**

TESIS

para optar al grado académico de Magíster en Biología molecular

AUTOR:

Dan Erick Vivas Ruiz

ASESOR:

Armando Yarlequé Chocas

Lima-Perú

2012

El presente trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y en las instalaciones del Servicio de Bioquímica y Química de Proteínas (SBQPs) de la Fundación Ezequiel Díaz en Bello Horizonte – Brasil; gracias al apoyo financiero proporcionado por el Consejo Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) mediante el programa de becas FONDECYT.

Gracias Dios por permitirme estar aquí para esta tesis, por ser tu voluntad antes que la mía.

La modestia conviene al sabio, pero no a las
ideas que posee y que *debe* defender

(Jacques Monod, 1971).

DEDICATORIAS

A mis padres, Teodoro y Estela, los dos pilares de mis valores y mis sentimientos, para ellos nuevamente: mi eterna gratitud.

A mis hermanos; Marco, Luis y Vanina, las fuentes de mis conocimientos más importantes; mis ejemplos de superación y perseverancia.

A Jesús y Nelida, dos guías en mi vida, por enseñarme que es lo bueno y que es lo malo.

A la memoria del gran Maestro Orestes Málaga Málaga, gracias por su confianza profe: y si...
nos vemos el lunes...

...Tú vas conmigo, yo voy contigo; yo caigo, tú me levantas. Por que esto es puro, porque esto es sincero, por que así son nuestros sentimientos, siempre tuyos, siempre míos, siempre nuestros...

AGRADECIMIENTOS

A los Doctores Armando Yarlequé Chocas, jefe del laboratorio de Biología Molecular FCB-UNMSM; y Eladio Flores Sánchez, jefe del laboratorio de Bioquímica y Química de Proteínas FUNED; por el asesoramiento brindado para la realización de esta tesis.

Al Magister Javier Cárdenas Tenorio, maestro y amigo, por permitir el uso de su ambiente de laboratorio en las pruebas iniciales para esta tesis.

A la Doctora Edith Rodríguez Quispe, por el continuo interés en el avance de esta tesis y por incorporarme al mundo laboral de la enseñanza, gracias por la confianza profesora.

A la Doctora Fanny Lazo Manrique, por el apoyo brindado en la realización de esta tesis y el continuo interés en mi desarrollo profesional; a ella toda mi estima y respeto.

A la profesora María del Pilar Suyo Titto, por estar pendiente de mis avances académicos y desarrollo profesional; de la misma manera al profesor Ruperto Severino por los ánimos y consejos más allá de mi vida profesional.

A la Doctora Rosio Inga, por lo primeros conocimientos adquiridos en el laboratorio, por enseñarme a mejorarlos, por mostrarme el camino de la superación en la vida; pero aún así... siempre estarás un paso adelante amiga.

Al Doctor Gustavo Sandoval, amigo y un guía en el mundo de las enzimas similares a trombina, por las críticas constructivas brindadas en el desarrollo de esta tesis.

A mis grandes amigos, el Magister Pedro Palermo y el Magister Julio Mendoza por darme y por permitirles darles ánimos cuando se quiere dar un paso al costado, me siento orgulloso de que sean mis amigos.

A los Biólogos Edgar Gonzales, César Ortiz, Mercedes Palomino, Candi Bellido y futuros Biólogos Frank Huari y Julio Delgadillo, por enseñarme a como enseñar.

Un agradecimiento especial a la Licenciada Gadi Pinto, mi amiga del alma, el punto y aparte de la Biología y la docencia, por hacerme recordar que parte de saber hablar es saber escuchar.

ÍNDICE

	Pág.
Introducción	13
Antecedentes	16
Materiales y Métodos	
Materiales	
Material biológico	19
Material de laboratorio	20
Métodos	
<i>Caracterización Molecular</i>	
Diseño de cebadores	23
Extracción y purificación de RNA	24
Síntesis de cDNA	24
Amplificación del gen	25
Secuenciación y análisis	25
<i>Caracterización funcional</i>	
Purificación de la barnetobina	26
Secuenciamiento del extremo amino terminal	28
Tipos de glicosilación de la barnetobina	28
Deglicosilación bajo condiciones no denatürantes	28
Determinación de hexosas, hexosaminas y ácido siálico	29
Actividad amidolítica	30
Actividad sobre tripérido sintético	31
Actividad esterásica	31
Actividad coagulante	31
Actividad fibrinogenolítica	32
Liberación de fibrinopéridos	32
Potencia coagulante	32

	Pág.
Estabilidad frente al pH	33
Estabilidad a la temperatura.	33
Susceptibilidad de la barnetobina frente a inhibidores	33
Actividad desfibrinante	34
Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA)	34
<i>Rol de los carbohidratos asociados</i>	
Actividad enzimática	34
Actividad biológica	35
Reconocimiento por el suero antiofídico	35
 Resultados y Discusión	
Secuencia nucleotídica de la barnetobina	36
Secuencia aminoacídica de la barnetobina	40
Identificación molecular de la barnetobina	42
Análisis estructura-funcional de la actividad similar a trombina de la barnetobina	46
Interacción de la barnetobina con algunos inhibidores	50
Rol de la N-glicosilación	52
Los carbohidratos asociados a la barnetobina	52
El rol de los carbohidratos asociados	56
La diversidad catalítica y la microheterogeneidad de las TLEs	59
Conclusiones	62
Referencias bibliográficas	63
Anexos	72

ABREVIATURAS

TLE	:	Thrombin like enzyme
Fg	:	Fibrinógeno
FPA y FPB	:	Fibrinopéptido A y fibrinopéptido B
CM-Sephadex C-50	:	Carboximetil Sephadex C-50
PMSF	:	Fenil metil sulfonil floruro
DTT	:	Ditiotreitol
EDTA	:	Etilen diamino tetra acético
TLCK	:	Tosyl lisil clorometil cetona
HPLC	:	Cromatografía líquida de alta performance
UTR	:	Regiones no traducidas
PAGE	:	Electroforesis en gel de poliacrilamida
SDS	:	Sodio dodecil sulfato
Tris	:	Tris (hidroximetil) amino metano
BAPNA	:	Benzoil arginil p nitroanilida
TAME	:	Tosyl arginil metil-ester
BAEE	:	Benzoil arginil etil-ester
NIH	:	National Institutes of Health
DDM	:	Dosis defibrinogenante mínima
DCM	:	Dosis coagulante mínima
HCl	:	Ácido clorhídrico
rpm	:	Revoluciones por minuto
μL y μg	:	Micro litro y microgramo
kDa	:	Kilo daltons
PNGasaF	:	peptidil N-glicosidasa F
TFA	:	Ácido trifluoroacético
TCA	:	Ácido tricloroacético
U	:	Unidades de actividad
M	:	Molaridad

RESUMEN

Bothrops barnetti es una serpiente venenosa que habita las regiones de costa sierra y selva de la zona norte de Perú. La enzima similar a trombina de esta especie, denominada barnetobina, fue estudiada a partir de la purificación de los ácidos nucleicos así como de la proteína misma para determinar sus características moleculares y funcionales. La secuencia del cDNA de la barnetobina de 750 pb codifica 233 residuos aminoacídicos, los cuales conservan dominios comunes con las serinoproteasas. La barnetobina muestra homología con otras enzimas similares a trombina de veneno de serpientes donde fueron identificados los aminoácidos correspondientes al sitio catalítico y también los subsitios de unión a sustrato S1, S2 y S3. Además, se encontró tres motivos para N-glicosilación. La enzima nativa purificada es una glicoproteína monomérica que bajo condiciones reductoras y no reductoras presenta las dimensiones de 52 kDa y 48 kDa respectivamente, las cuales decrecen a 27 kDa después de la deglicosilación con PNGasa F. La barnetobina mostró actividad catalítica sobre fibrinógeno bovino, plasma y fibrinógeno humano, BApNA, TAME, BAEE y Chromozym TH; asimismo, produjo defibrinación cuando fue suministrada a ratones por vía subcaudal. La proteasa logró liberar rápidamente el fibrinopéptido A del fibrinógeno humano. La actividad coagulante específica de la enzima fue equivalente a 251,7 NIH U/mg de trombina sobre fibrinógeno bovino. Las actividades amidásica y coagulante fueron inhibidas por el PMSF, el inhibidor de tripsina de soya y el DTT; en contraste, el 2β-mercaptoetanol, TLCK, EDTA y la heparina tuvieron poco o ningún efecto sobre la actividad amidásica. En este estudio se demostró la importancia de los carbohidratos N-ligados sobre la actividad similar a trombina de la barnetobina, la cual perdió su actividad biológica y enzimática cuando los carbohidratos fueron removidos. Se concluye que la barnetobina es una serinoproteasa coagulante del fibrinógeno cuyos azúcares asociados estarían involucrados en la estabilidad enzimática y la unión a sus sustratos.

Palabras clave: Barnetobina, *Bothrops barnetti*, enzima similar a trombina, N-glicosilación, veneno.

ABSTRACT

Bothrops barnetti is the most important venomous snake in the northern part of Peru, inhabiting the coastal, Andean and jungle regions. The thrombin-like enzyme from this species, named barnetobin, was studied isolating the nucleic acid sequence as well as the its proteic complement to determine its molecular and functional characteristics. The cDNA sequence of Barnetobin with 750 bp encodes 233 amino acid residues, which conserve common domains of serine proteases. Barnetobin shows homology with other snake venom thrombin like enzymes where common aminoacid residues were identified as those corresponding to the catalytic site and binding substrates subsites S1, S2 and S3, already reported. Also, three functional motifs for N-linked glycosylation were found. Biochemical studies indicated that the purified enzyme is a monomeric glycoprotein with a molecular size of 52 kDa and 48 kDa, on SDS-PAGE under reducing and non reducing condition respectively, which decreased to 27 kDa after deglycosylation with PNGase F. Barnetobin showed catalytic activity upon substrates, such as fibrinogen, human plasma, BApNA, TAME, BAEE and Chromozym TH and caused defibrination when was injected into sub caudal vein of the mice. The proteinase cleaved fibrinopeptide A from bovine fibrinogen; however, only negligible traces of fibrinopeptide B were observed. The coagulant specific activity of the enzyme was equivalent to 251,7 NIH thrombin U/mg on bovine fibrinogen. The coagulant and amidase activities were inhibited by PMSF, soybean trypsin inhibitor and DTT. In contrast, 2 β -mercaptoethanol, TLCK, EDTA and heparin had little or no effect on its amidase activity. In this study, the importance of N-Linked glycans to improve the thrombin-like activity of barnetobin was demonstrated, which lost its biological activity and enzymatic stability when carbohydrates were removed. We conclude that barnetobin is a fibrinogen-clotting serinoprotease which its associated sugars could be involved in enzyme stability and in binding to their substrates.

Keywords: Barnetobin, *Bothrops barnetti*, thrombin-like enzyme, N-glycosylation, venom.

INTRODUCCIÓN

Dentro del mundo natural, los venenos de las serpientes han sido definidos como verdaderos arsenales que les permiten la captura de sus presas así como también defenderse de presuntos depredadores. Lograr asirse a una presa involucra la inmovilización y la muerte de la misma; y es, en el entendimiento de estos procesos, que se ha llegado a establecer que los componentes claves en la mayoría de serpientes vipéridas, son las enzimas (Chippaux et al., 1991; Fry, 2005; Kini, 2005).

Para lograr el colapso de todo un sistema fisiológico, las enzimas actúan de una manera compleja y ordenada actuando en sinergismo desde su inoculación. Las hialuronidasas, por ejemplo, son los agentes difusores del veneno; las metaloproteasas, tienen como objetivo modificar estructuras celulares que se manifiesta en la alteración de tejidos y; otros componentes, como las serinoproteasas, producen serias alteraciones fisiológicas a nivel renal y hemostático (Braud et al., 2000).

Es coherente entonces pensar que estas enzimas han de poseer estructuras singulares que les permitan actuar, de una manera eficaz, en un ambiente tan diferente al medio en donde fueron producidas. Un ejemplo claro se da para todas aquellas enzimas ofídicas que actúan a nivel del sistema hemostático, aquí se presenta un dinamismo que no existe en las glándulas exocrinas productoras del veneno; asimismo, los parámetros bioquímicos como pH, temperatura, sales, iones etc. son diferentes. Sin embargo, las enzimas del veneno de una serpiente vipérida han llegado a adquirir no sólo una estabilidad enzimática en el torrente sanguíneo de la presa; si no que también, han adquirido una irrefutable especificidad enzimática: enzimas que activan el plasminógeno, la protrombina, el factor V y X; otras inducen o inhiben la agregación plaquetaria; otro grupo, posee actividad hemorrágica y finalmente un grupo particular se encarga de degradar o coagular el fibrinógeno (Braud et al., 2000). El que estas enzimas puedan desarrollar todas estas actividades es gracias a que cuentan con la estructura adecuada para poder soportar la hostilidad que representa el flujo sanguíneo.

Un grupo particular de estos catalizadores biológicos, que desarrollan su actividad en el torrente sanguíneo, son las conocidas enzimas similares a trombina o TLEs (Thrombin Like Enzymes). Estas enzimas, tienen la capacidad de actuar sobre el fibrinógeno de una manera parecida a lo que hace la trombina; no obstante, la única semejanza que tienen estas dos enzimas, aparte de actuar sobre un sustrato en común, es que ambas pertenecen al grupo de las serinoproteasas. Sin embargo, hay marcadas diferencias tanto estructurales como funcionales entre TLEs y la trombina: 1) las TLEs se dividen en aquellas que sólo pueden liberar fibrinopéptidos A ó B, son pocas las TLEs que liberan ambos fibrinopéptidos como lo hace la trombina, 2) no requieren, por lo general, modificaciones alostéricas, 3) no son inhibidas por la heparina y la antitrombina, clásicos inhibidores de la trombina, 4) a diferencia de esta última las TLEs no son multifuncionales y 5) molecularmente están más relacionadas a la quimotripsina que a la propia trombina (Castro et al., 2004).

La característica más peculiar de las TLEs está en su principal efecto biológico, transformar el fibrinógeno en geles inestables de fibrina, los cuales son degradados rápidamente por los procesos fibrinolíticos secundarios, haciendo que los niveles de fibrinógeno endógeno disminuyan considerablemente. Este hecho hace que la sangre se torne incoagulable y, por la acción de otros componentes como las metaloproteasas, salga de los vasos sanguíneos produciendo una severa hemorragia (Denson et al., 1972; Stocker et al., 1982; Farid y Tu, 1989; Kamaguti y Cardoso, 1989; Ouyang et al., 1992).

Se ha despertado mucho interés el modo de acción de este grupo de enzimas. En principio, cuentan con un plegamiento semejante pero mantienen diferencias únicas entre sí a nivel de los procesos postraduccionales como la glicosilación, que permite la microheterogeneidad de estas enzimas y por ende comportamientos singulares en su modo de acción como lo es la resistencia a las temperaturas elevadas, cambios bruscos de pH, preferencia por cierto tipo de sustrato y en última instancia el que puedan evadir el sistema proteolítico de defensa de la presa o del agresor (Lochnit y Geyer, 1995).

Queda claro que el entendimiento del cómo están estructuradas estas proteínas permite fundamentar su funcionalidad, máxime cuando estas moléculas se han convertido en agentes clínicos promisorios, ya que se usan como desfibrinogénantes, en tratamiento de trombosis, infarto al miocardio, desórdenes vasculares periféricos, isquemia aguda y rechazo en los trasplantes renales, (Funk, et al., 1971; Stocker y Meier 1988; Koh et al., 2006).

La presente investigación se centra en el estudio a nivel molecular y funcional de la barnetobina (Vivas et al., 2010) una enzima similar a trombina aislada del veneno de la serpiente peruana *Bothrops barnetti*, que habita en los departamentos de La Libertad, Lambayeque, Cajamarca, Piura y Tumbes (Carrillo e Icochea, 1995; Asencios y Cutii, 1995) y es la principal responsable de los casos de ofidismo para esas zonas (Zavaleta y Salas, 1996). La barnetobina ha demostrado poseer algunas características bioquímicas peculiares como su alto grado de glicosilación y su significativa estabilidad ante los cambios de pH y temperatura. El estudio de esta proteína permitirá establecer su rol en el proceso de envenenamiento con miras a dirigir un tratamiento adecuado para las coagulopatías producidas por la mordedura y poder sentar las bases para su uso como una herramienta biotecnológica.

ANTECEDENTES

El descubrimiento de las alteraciones en el sistema hemostático producido por los venenos de las serpientes datan desde hace más de dos siglos (Mitchell y Reichert, 1883), en esa época ya se había establecido que las coagulopatías eran una característica de los venenos vipéridos y que el tipo de efecto coagulante o anticoagulante dependía de la dosis inoculada (Phisalix, 1899). Existían ciertas hipótesis que trataban de explicar el efecto coagulante, atribuyendo la presencia de una proteína que activaba a la trombina del paciente o a la existencia de una trombina preformada en el veneno de la serpiente (Noc, 1904).

En 1967, Esnouf y Tunnah, aislaron la primera enzima similar a trombina (TLE) del veneno de *Agkistrodon rhodostoma* a partir de ello, se estableció fehacientemente la actividad coagulante *in vitro* y anticoagulante *in vivo* de estas enzimas; es así que, pocos años después, el descubrimiento de características peculiares encontradas en estas proteasas y algunas diferencias funcionales con respecto a la trombina conllevaron a su primeros estudios como agentes terapéuticos siendo *Ancrod®* (conocida antiguamente como Arvin) la primera TLE usada como potencial fármaco seguida de *Reptilasa®* una TLE obtenida del veneno *Bothrops atrox* (Pitney et al., 1969; Ewart et al., 1970; Mattock y Esnouf, 1971; Turpie et al., 1971).

La potencialidad farmacéutica de estas enzimas incrementó la búsqueda, purificación y caracterización de TLEs en otros venenos de serpientes. En 1981 se realizó el primer estudio de la estructura primaria de la crotalasa obtenida del veneno *Crotalus adamanteus* (Pirkle et al., 1981), en donde se incluye a las TLEs como parte del grupo de las serinoproteasas y su relación con la calikreina. Siete años mas tarde, el empleo de cDNA de las glándulas del veneno permitió dirigir el primer estudio a nivel génico, de batroxobin del veneno de *Bothrops moojeni*, en el cual se determinó que las TLEs pertenecen a la familia génica tripsina/kalikreina con la presencia de 5 exones y 4 intrones que en conjunto conforman un tamaño génico de aproximadamente 8 kpb (Itoh et al., 1988).

Para 1998 más de 40 TLEs habían sido descubiertas, algunas de ellas ya contaban con los estudios de su estructura primaria en donde se pone de manifiesto que la mayoría de las TLEs tenían modificaciones postraduccionales importantes como la glicosilación, que en otras serinoproteasas alcanzan hasta el 60% de su masa molecular y se ponía de manifiesto que algunas de estas enzimas como habutobin (TLE de *Trimeresurus flavoviridis*) tenían actividad sobre fibrinógeno endógeno de especies específicas (Kinjoh et al., 1997; Pirkle, 1998; Muruyama et al., 2003).

En el 2004 se estableció que todas las TLEs poseían una característica única entre el grupo, la presencia de la triada catalítica His₅₇, Asp₁₀₂ y Ser₁₉₅ (correspondiente a la estructura de la quimiotripsina), propias de las serinoproteasas; un hecho importante también es que, estas enzimas no poseen semejanza estructural y funcional alguna con la trombina, ya que la gran mayoría sólo corta una de las dos cadenas del fibrinógeno y no las dos a la vez, además no eran inhibidas por la heparina, principal inhibidor de la trombina, pero eran susceptibles a los clásicos inhibidores de las serinoproteasas (Castro et al., 2004). En el 2005, una revisión en las investigaciones de serinoproteasas indicaba que si bien estas enzimas poseían una alta homología no tenían la misma especificidad sobre los sustratos sino que iba acorde a la presencia o no de regiones de unión a sustrato y la forma como estaban plegadas las regiones circundantes al sitio activo (Serrano y Maroun, 2005).

En la última década, se ha determinado que la modificación postraducciona l más relevante en las TLEs es la N glicosilación, responsable de la microheterogeneidad bioquímica de estas enzimas. En el 2010 se realizó un estudio en Defibrasa (TLE de *Agkistrodon acutus*) cuyo contenido de carbohidratos era a base galactosa, manosa, fucosa, N-acetilglucosamina N-galactosamina y ácido siálico. Asimismo, a los carbohidratos asociados se les atribuye muchos roles en el desempeño de la actividad enzimática que involucran el plegamiento de la proteína, resistencia térmica, cambios de pH, unión al sustrato y la modulación de las respuestas inmunológicas (Luo et al., 2010; Lin et al., 2009; Sant'Ana et al., 2008; Silva-Junior et al., 2007; Serrano y Maroun 2005, y Castro et al., 2004). Por otro lado, en estos dos últimos años ha sido posible la expresión de forma recombinante de enzimas

similares a trombina, tanto en modelos procarióticos como eucarióticos, esto, con miras de poder tener mayor cantidad de enzima para el estudio de sus propiedades bioquímicas, moleculares, biológicas y farmacológicas (Lin et al., 2009).

Dentro de las ponzoñas de vipéridos peruanos se ha encontrado y caracterizado químicamente las enzimas similar a trombina de *Lachesis muta*, *Bothrops brazili*, *B. bilineatus*, *B. pictus* y *B. barnetti* (Yarlequé, 1989; Liman, 1996; Mesia, 1996; Cahuana, 1996 y Vivas, 2008); hasta la fecha, sólo la TLE de *Bothrops atrox* ha sido estudiada a nivel molecular (Ponce Soto, 2007; Sandoval et al., 2010).

En relación a estos antecedentes, el presente trabajo ha tenido como objetivos fundamentales la caracterización molecular de la enzima similar a trombina presente en el veneno de la serpiente peruana *B. barnetti* y la determinación del papel de la N-glicosilación en la actividad enzimática; basados en la hipótesis que “*dado que la enzima similar trombina de B. barnetti presenta un elevado contenido de carbohidratos, es posible que estos carbohidratos deban tener participación importante en la estructura, estabilidad y actividad enzimática de la proteína*”.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

a) Material Biológico

- *Veneno*

Se utilizó veneno de la serpiente *B. barnetti* de ejemplares procedentes de Santa Cruz (Cajamarca), mantenidos en el Serpentario “Oswaldo Meneses” del Instituto Nacional de Salud – Lima (Lote B.bar1L-2002). El veneno fue extraído por presión manual, liofilizado y conservado a -8 °C hasta su uso. Este material biológico fue proporcionado por el INS mediante convenio con la UNMSM.

- *Antiveneno*

El antiveneno empleado fue el suero antibotrópico polivalente líquido, producido por el Instituto Nacional de Salud, lote 00300079 con fecha de expiración Marzo 2011, el cual contiene anticuerpos equinos neutralizantes contra el veneno de 4 especies del género *Bothrops* y una del género *Bothrocophias* que son: *B. atrox*, *B. barnetti*, *B. brazili*, *B. pictus* y *B. hyoprora* respectivamente. Cada vial contenía 10 mL de antiveneno que neutralizan no menos de 25 mg del veneno de *B. atrox*.

- *Animales de experimentación*

Se emplearon ratones albinos cepa Balb C machos (18 a 22 g) criados en el bioterio del Instituto Nacional de Salud.

- *Plasma humano citratado*

Se obtuvo sangre venosa de personas saludables voluntarias; la cual fue recibida en tubos que contenían citrato de sodio 3,8 % (1:9). Las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm x 10 min y el plasma sobrenadante fue alicuotado en fracciones de 0,2 mL para su uso.

b) Material de laboratorio

- *Sustratos para actividades enzimáticas:*

- Fibrinógeno bovino diluido en buffer fosfato salino (PBS) 0,02 M, pH 7,4 hasta una concentración de 5 mg/mL.
- Tosyl arginil metil-ester (TAME) y Benzoil arginil etil-ester (BAEE), disueltos en buffer Tris-HCl 0,05 M, pH 7,4 hasta una concentración de 2 mM.
- Benzoil-arginil-p-nitroanilida (BAPNA) disuelto en dimetil sulfóxido hasta una concentración de 0,09 M. Para realizar la actividad enzimática fue disuelto hasta una concentración de 0,9 mM en buffer Tris-HCl 0,05M, pH 8,1.

Los reactivos anteriores fueron de la marca Sigma Chemical Company, St. Louis, USA.

- Tosyl-glycyl-prolyl-arginyl-4-nitranilina acetate (Chromozym TH, Roche®) 5 mg diluidos en agua destilada hasta un volumen de 4 mL.

- *Enzimas:*

- Enzima similar a trombina de *Bothrops leucurus*, *Crotalus durissus terrificus* y *Lachesis muta muta*. Proporcionados gentilmente por el Dr. Eladio Flores Sánchez (FUNED- Brasil).
- PNGasa F de *Elizabethkingia meningsepticum* recombinante expresada en *Escherichia coli* (Sigma®).
- O-Glicosidasa de *Streptococcus pneumoniae* recombinante expresada en *Escherichia coli* (Sigma®).
- Trombina bovina (Sigma®).

- *Kits para la obtención y amplificación de ácidos nucleicos.*

Kit Total RNA Purification (AMRESCO®), Kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis (Roche®) y Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen™).

- *Buffers*

Buffer fosfato salino 0,02 M, pH 7,4; buffer acetato de amonio 0,05 M pH 5,0; buffer Tris-HCl 0,05 M, buffer acetato de sodio 0,2 M buffer fosfato de sodio 0,2 M a diferente pH cada uno.

- *Inhibidores*

Iodoacetato, glutatión, heparina, ditioneitol (DTT), ácido glutámico, 2β-mercaptoetanol, inhibidor de tripsina de soya, tosyl lisil clorometil cetona (TLCK), fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF), ácido etilen diamino tetra acético (EDTA).

- *Reactivos para electroforesis de ácidos nucleicos*

Agarosa tipo I (Calbiochem®) al 1% en agua destilada, Buffer TBE X (Tris 892 mM, ácido bórico 889 mM y EDTA 20 mM pH 0,5), buffer muestra (Novagen®), bromuro de etidio (10 g/L).

- *Reactivos para electroforesis de proteínas*

Solución stock de acrilamida (acrilamida 30%, bis-acrilamida 0,8%), buffer de gel de resolución (Tris-HCl 1,5 M pH 8,8); buffer del gel de apilamiento (Tris-HCl), buffer muestra (Tris-HCl 0,05 M, pH 6,8, SDS 2 %, azul de bromofenol 0,1%, glicerol 10%), buffer de corrida (Tris-HCl 0,025 M, pH 8,3 glicina 0,192 M, SDS 0,1%), N,N,N',N'-tetrametiletilendiamino (TEMED), persulfato de amonio (PSA), azul brillante de Coomassie R-250, metanol, ácido acético.

- *Reactivos para ELISA*

Buffer de cubierta (carbonato de sodio 15 mM, bicarbonato de sodio 35 mM pH 7,6), buffer fosfato salino (PBS) 0,15 M pH 7,4, buffer de incubación (leche descremada al 5 % Tween-20 0,05% en PBS pH 7,4), buffer de lavado (NaCl 0,15 M, Tween-20 0,05%), buffer de bloqueo (Leche descremada al 3%, Tween-20 0,05% en PBS pH 7,4), anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina, p-nitrofenil fosfato, NaOH 3 M.

- *Patrones para electroforesis*
 - Albúmina sérica bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) lisozima (14,3 kDa) Todos marca Sigma®.
 - Marcadores de 2000, 1500, 1000, 750, 500, 300 150 y 50 pb DNA Novagen®

- *Geles cromatográficos*

Sephadex G-100 y CM-Sephadex C-50 (Sigma) ambas fueron inicialmente resuspendidas en agua destilada y posteriormente equilibrada con buffer acetato de amonio 0,05M pH 5,0 y empaquetadas en columnas cromatográficas de dimensiones 1,4 x 64 cm y 1,2 x 45 cm respectivamente.

- *Herramientas bioinformáticas*
 - *Translate Tool* (<http://ca.expasy.org>).
 - *Clustal X 1.8* (<http://www.clustal.org>).
 - *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).
 - *Mega 4.1* (<http://www.megasoftware.net/>).
 - *Signal P* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).
 - *Protparam* (<http://ca.expasy.org/tools/protparam.html>).
 - *ORF finder* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>).
 - *BLASTn y BLASTp* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).
 - *PIR* (<http://pir.georgetown.edu/pirwww/search/pattern.shtml>).
 - *Bioedit 7.0.4* (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>).
 - *Cn3D4.1* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml>).
 - *Box Shade 3.21* (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html).

- *Equipos*
 - Equipo para cromatografía líquida de alta performance (HPLC) Agilent 1100, Bondapack columna Vydac C₁₈ (218TP54).
 - Colector automático de fracciones LKB-Pharmacia

- Lectora de placas de ELISA, Titertek Multiscan PLUS MKIL.
- Secuenciador de proteínas automatizado Shimadzu PPSQ-21^a
- Potenciómetro digital 610 Lab pH meter.
- Espectrofotómetros Shimadzu UV y Spectronic Genesis 5.
- Fotocolorímetro Spectronic Bausch & Lomb.
- Balanza analítica Ainsworth.
- Centrifugadora Sorvall Instruments Modelo Easy Spin.
- Microcentrífuga Denver Instrument.
- Liofilizador Labconco.
- Baño de temperatura Memmert.
- Equipo de electroforesis vertical en placa Sigma Techware.
- Fuente de poder para electroforesis Duostat Beckman.
- Transiluminador UVStar 312nm Biometra.
- Cámara para inmunoelectroforésis Gelman Sciences.
- Termociclador Eppendorf Mastercycler Personal.
- Cuantificador de ácidos nucleicos Qubit fluorometer (InvotrogenTM).
- Equipo de electroforesis horizontal Wide Mini-Sub Cell GT System Bio-Rad.

2. MÉTODOS

2.1.Caracterización Molecular

2.1.1. Diseño de cebadores

Después de haber realizado una búsqueda en artículos científicos y en la base de datos del GenBank, 6 secuencias del mRNA de enzimas similares a trombina (con tamaño promedio de 14000 pb) fueron seleccionadas para el diseño de cebadores; estas secuencias con sus respectivos códigos de acceso corresponden a las serpientes: *Bothrops atrox* (J02684.1), *Bothrops jararaca* (AB178321.1), *Bothrops jararacusu*

(AY251282.1), *Bothrops insularis* (AF490536.1) *Bothrops asper* (DQ247724.1) y *Gloydius ussuriensis* (AF336126.1).

El alineamiento de estas secuencias fue realizada con el uso del programa Bioedit 7.0.4 (Hall, 1999) empleando el algoritmo Clustal W (Thompson et al., 1994) y su edición en formato FASTA fue realizada mediante el programa Box Shade 3.21 (K. Hofmann and M. Baron, <http://www.ch.embnet.org/software/BOXform.html>). Posteriormente, se procedió al diseño de cebadores en forma manual teniendo en cuenta las regiones más conservadas del alineamiento. La síntesis de cebadores fue encargada a casa comercial Invitrogen Custom Primers.

2.1.2. Extracción y Purificación de RNA

500 µl de veneno fueron extraídos de un espécimen juvenil hembra de *B. barnetti* procedente de la localidad de Santa Cruz (Dpto. Cajamarca) y mantenido en el Serpentario Oswaldo Meneses del Instituto Nacional de Salud. La extracción se realizó en forma mecánica y el veneno fue recibido en viales estériles, libres de DNAsas y RNAsas, e inmediatamente fueron colocados en hielo y transportados en cadena de frío hacia las instalaciones del laboratorio donde se procedió a realizar la extracción del mRNA mediante el empleo del Kit Total RNA Purification (AMRESCO) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.1.3. Síntesis de cDNA

Para la síntesis de los cDNA se empleó el kit “Transcriptor First Strand cDNA Síntesis”, colocando en un tubo de PCR en frío, 7 µl de RNA purificado, 1 µl de primer “anchored-oligo(dT)₁₈”, 1 µl de primer “random hexamero” y 4 µl de agua grado molecular. Se denaturó la mezcla calentando por 10 min a 65 °C, se detuvo la reacción por enfriamiento brusco; se continuó agregando 4 µl de buffer de reacción, 0,5 µl de inhibidores de RNAsa, 2 µl de deoxinucleótidos y 0,5 µl de la

transcriptasa reversa. Se incubó la mezcla por 10 min a 25 °C seguido de 60 min a 50 °C, se inactivó la transcriptasa reversa por calentamiento a 85 °C por 5 min y se colocó el tubo en frío para guardarlo a -25 °C para su posterior amplificación.

2.1.4. Amplificación del gen

La amplificación del gen de la barnetobina se realizó mediante el uso del kit Master Mix Platinum® *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen™). La mezcla de reacción contenía 22 µl del mix comercial, 1 µl de cebador forward, 1 µl de cebador reverse y 1 µl de cDNA. Las condiciones de cada ciclo de reacción programadas fueron: un ciclo de desnaturación 95 °C por 5 min; seguido por 32 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 seg., hibridación 54 °C por 30 seg y polimerización a 72 °C durante 70 seg. Finalmente, se incubó a 72 °C por 7 min. En todos los casos se consideró controles negativos de la reacción de PCR sin añadir cDNA molde. Los productos de PCR obtenidos se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% en buffer TBE 1X corridos a voltaje constante de 80 V. Posteriormente se tiñeron con bromuro de etidio y visualizados en el transiluminador. La cuantificación del ADN obtenido se realizó por espectrofotometría empleando el equipo Qubit fluorometer (Invitrogen™).

2.1.5. Secuenciación y análisis

La secuenciación de los productos amplificados se realizó por solicitud de servicios a la casa comercial Macrogen, Inc (Korea del sur) mediante el uso de un secuenciador automatizado: ABI 3730 XL con capacidad máxima de 12 Mb/día.

La secuencia nucleotídica obtenida fue analizada y editada mediante el programa Clustal X 1.8 y el redactor biológico *BioEdit*. La identificación de la secuencia así como el análisis de semejanza con otras secuencias depositadas en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) se realizó

empleando el programa BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). El análisis de los marcos de lectura abierta y la traducción de la secuencia nucleotídica fueron obtenidos mediante los programas *ORF finder* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) y *Translate Tool* (<http://ca.expasy.org>).

Al igual que la secuencia nucleotídica, la proteína deducida fue analizada tanto en identidad como en semejanza con otras secuencias de TLEs mediante el empleo del programa BLASTp. Todos los alineamientos tanto como la edición de estos fueron hechos con los programas Clustal X 1.8 y BoxShade (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html). La predicción de las propiedades bioquímicas de la proteína deducida fue realizado mediante el programa Protparam (<http://ca.expasy.org/tools/protparam.html>), la determinación del péptido señal mediante el programa Signal P (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). La presencia de dominios en la proteína fue realizada con los programas BLASTp y PIR (<http://pir.georgetown.edu/pirwww/search/pattern.shtml>). La deducción de la estructura tridimensional de la barnetobina fue realizada utilizando el programa Cn3D4.1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml>) usando como modelo la proteína activadora de plasminógeno de *Trimeresurus stejnegeri*. El programa MEGA5 se empleó para la elaboración de relaciones de parentesco de la barnetobina con otras TLEs.

2.2. Caracterización funcional

2.2.1. Purificación de la barnetobina

En el presente trabajo se realizó una modificación en el criterio de purificación de la enzima similar a trombina de *Bothrops barnetti* establecido por Vivas et al., 2010:

Para el primer paso, 300 mg en peso de veneno liofilizado fueron disueltos en 2 mL de acetato de amonio 0,05 M (pH 5,0) centrifugados a 3000 rpm por 15 min para remover las partículas insolubles. El sobrenadante fue aplicado a una columna de 1,4 x 64 cm empacada con el gel de filtración Sephadex G-100 equilibrada y eluída con el mismo buffer. Se recolectaron fracciones de 3 mL a un flujo de 14 mL/h. Todas aquellas fracciones con actividad similar a trombina fueron juntadas y concentradas por centrifugación empleando los tubos Amicon Ultracel- 30K hasta un volumen de 1,2 mL.

El concentrado resultante (105,8 mg de proteína) fue aplicado a una columna empacada con el gel de intercambio catiónico CM Sephadex C-50 (1,2 x 45 cm) equilibrada con el buffer del primer paso. Aquellos componentes que no se adhirieron a la columna fueron eluidos con 90 mL del buffer inicial (acetato de amonio 0,05 M pH 5,0), los componentes adheridos fueron eluidos con el mismo buffer pero estableciendo una gradiente de concentración de NaCl de 0,1 a 1 M. Se recolectaron fracciones de 3 mL a un flujo 14 mL/h, los tubos que presentaron actividad similar a trombina fueron nuevamente concentrados por ultrafiltración hasta un volumen de 0,6 mL. El nuevo concentrado (6,4 mg de proteína), fue aplicado a una nueva columna de Sephadex G-100 (1 x 30 cm) equilibrada con el buffer del primer paso. Se recolectaron fracciones de 1 mL a un flujo de 15 mL/h.

Para los tres pasos cromatográficos el contenido proteico fue monitoreado a 280 nm, la concentración de proteína fue determinada por el método de Lowry et al., 1951 y la actividad enzimática fue evaluada usando el sustrato cromogénico BApNA. La evaluación de purificación de la proteína se hizo por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS) de acuerdo a Laemmli (1970).

2.2.2. Secuenciamiento del extremo amino terminal

La secuencia N-terminal de la barnetobina fue determinada usando un secuenciador de proteínas automatizado Shimadzu PPSQ-21A, basado en Edam y Begg (1967), usando una solución con aproximadamente 1 mg/mL de la enzima purificada. La secuencia y la homología de los aminoácidos fueron analizadas por alineamiento usando el programa BLASTp (Basic Local Alignment Search Tool; Alschul et al., 1997). Este procedimiento fue realizado dos veces.

2.2.3. Tipos de glicosilación de la barnetobina

Para evaluar los tipos de glicosilación que posee la barnetobina 50 µg de la enzima purificada fue diluida en buffer de reacción (50 mM Tris-HCl, pH 8,0) en un volumen final de 50 µl, posteriormente se agregaron 2,5 µl de solución de desnaturalización (SDS 2% y 1M de 2-β mercaptoetanol), se sometió la muestra a calentamiento por 5 min a 100 °C e inmediatamente se detuvo en frío. Se agregaron 2,5 µl de solución detergente (IGEPAL® 15%) y finalmente se añadió 2 µl de la enzima PNGasa F (N-glicosidasa) u O-glicosidasa. La muestra fue incubada a 37 °C por 24 horas deteniéndose por calentamiento con buffer muestra para PAGE-SDS y analizada por medio de electroforesis.

2.2.4. Desglicosilación de la barnetobina bajo condiciones no denaturnantes

Esta metodología se basa en la realizada por Silva-Junior et al., (2007) con el objetivo de obtener a la enzima activa sin sus carbohidratos. Básicamente la metodología implica la incubación de la enzima con PNGasa F, sin adición de los agentes desnaturalizantes ni reductores, por un periodo de 48 horas.

2.2.5. Determinación de hexosas, hexosaminas y ácido siálico.

a) Hexosas

Mediante esta técnica, las hexosas asociadas a la proteína son hidrolizadas produciendo el hidroximetilfurfural, un compuesto incoloro intermediario, el cual reacciona con el orcinol, formando un compuesto coloreado que puede ser determinado fotolorimétricamente (Winzler, 1955).

La mezcla de reacción contenía: 0,2 ó 0,4 mL del veneno crudo (1 mg/mL) o de la enzima purificada (0.2 mg/mL), completados con agua destilada hasta 0,5 mL; 2 mL del reactivo Orcinol-H₂SO₄, calentándose luego a 80 °C por 30 min y dejando enfriar en agua, para finalmente medir la absorbancia de esta mezcla a 540 nm.

b) Hexosaminas

La prueba se fundamenta en la hidrólisis ácida de la muestra, lo cual provoca la liberación de la hexosamina y su acetilación con acil acetona; su posterior tratamiento con un álcali; forma un pirrol, el cual se une al p-dimetilaminobenzaldehido (Reactivo de Ehrlich) para formar un compuesto coloreado que fotométricamente se determina a 530 nm (Winzler, 1955).

La mezcla de la reacción contenía: 0,2 ó 0,4 mL del veneno de *B. barnetti* (9,5 mg/mL) ó 0,5 mL de la barnetobina (0,190 mg/mL), previamente hidrolizados con HCl 3N en agua hirviendo por 4 h y neutralizados con NaOH 3N, completando con agua destilada a 0,5 mL. Se añadió luego 0,5 mL de acetilacetona, se mezcló y se hizo hervir por 15 min. Posteriormente se adicionó 2 mL de etanol al 95% más 0,5 mL del Reactivo de Ehrlich, para finalmente medir después de 30 min la absorbancia de la mezcla a 530 nm.

c) *Ácido siálico*

Se fundamenta en la remoción de los grupos acetilo o glicolilo del grupo amino de los ácidos siálicos por un medio fuertemente ácido. El producto de esta reacción se oxida por la acción del periodato; y el ácido β -formilpirúvico, se acopla con el ácido 2-tiobarbitúrico, formándose un cromóforo rojo con un máximo de absorción a 549 nm que es extraído de la mezcla con ciclohexanona (Warren, 1959).

La mezcla de reacción contenía 0,1 mL de veneno crudo de *B. barnetti* (10 mg/mL) ó 0,2 mL de la barnetobina (0,190 mg/mL) previamente sometidos al calor a 80 °C por 1 h en H₂SO₄ 0,1 N, completándose 0,2 mL con agua destilada. Se adicionó 0,1 mL de solución de periodato de sodio, se homogenizó dejando en reposo por 20 min a temperatura ambiente, posteriormente se adicionó 1 mL de solución de arsenito de sodio, agitando hasta desaparecer el color amarillo más 2 mL de ácido 2-tiobarbitúrico. Los tubos fueron colocados en un baño de agua hirviendo por 15 min. A una alícuota de 1,5 mL de la mezcla se agregó ciclohexanona en proporción 1:1, se agitó 2 veces y se centrifugó 3000 rpm por 10 min, midiéndose la absorbancia del sobrenadante a 549 nm.

2.2.6. *Actividad amidolítica*

Fue determinada por el método de Erlanger et al. (1961), empleando el sustrato cromogénico específico para serinoproteasas benzoil-arginil-p-nitroanilida (BAPNA) midiéndose la liberación de p-nitroanilina a 405 nm.

La mezcla de reacción contenía 1 mL de BAPNA a una concentración de 9×10^{-4} M, 0,45 mL de buffer Tris HCl 0,05 M pH 8,1 y 25 μ L de la enzima purificada. Luego de incubar por 15 min a 37 °C se adicionó 1 mL de ácido acético al 60 % para detener la reacción y luego medirla a 405 nm.

2.2.7. *Actividad sobre tripéptido sintético*

Se determinó por el método de Svendsen (1977), utilizando tosyl-glycyl-prolyl-arginyl-4-nitranilina acetate (Chromozym TH) como sustrato. El sustrato sintético es un derivado tripeptídico en el que la p-nitroanilina está unida como grupo cromógeno mediante un enlace amida al grupo carboxilo de la arginina. La hidrólisis enzimática del sustrato produce la liberación del grupo p-nitroanilina, el cual es cuantificado a 405 nm.

Se disolvió el Chromozym TH (5 mg) en agua destilada en un volumen final de 4 mL. La mezcla de reacción contenía 2,8 mL de buffer Tris-HCl 0,05 M pH 8,3 con NaCl 0,2 M más 0,3 mL de Chromozym TH. Los tubos se incubaron por 5 min a 37°C. Posteriormente, se adicionó 0,1 mL de veneno crudo (0,5 mg/mL) o de la barnetobina (0,112 mg/mL). Se registraron lecturas cada minuto por un lapso de 8 min a 405 nm.

2.2.8. *Actividad esterásica*

La enzima similar a trombina tiene usualmente habilidad para hidrolizar ésteres sintéticos como el tosyl arginil metil-ester (TAME) y benzoil arginil etil-ester (BAEE).

1,5 mL de TAME ó BAEE a 2 mM y 1,4 mL buffer Tris HCl 0.05 M pH 7,4 se incubaron por 3 min a 37 °C adicionándose luego 0,1 mL de la barnetobina, registrándose las lecturas en el espectrofotómetro a 247 nm (TAME) y 253 nm (BAEE), de acuerdo al método de Schmert y Takenaka (1955).

2.2.9. *Actividad coagulante*

Fue realizada según el método descrito por Copley (1973), usando plasma humano citratado o fibrinógeno (Fg) bovino, este último a una concentración de 5 mg/mL en buffer Tris HCl 0,05 M pH 7,4; la mezcla de reacción contenía 0,2 mL del sustrato y 0,1 mL de NaCl 0,9% tamponado a pH 7,4; preincubándose por 10 min a 37 °C para luego agregar de enzima purificada.

Se determinó la actividad enzimática dividiendo la inversa del tiempo de coagulación entre los miligramos de proteína utilizada. Asimismo, se calculó la dosis coagulante mínima (DCM) para ambos sustratos, que es la cantidad de muestra (μg) que produce un coágulo en 60 seg (Instituto Clodomiro Picado, 2007).

2.2.10. *Actividad fibrinogenolítica*

La actividad fibrinogenolítica fue determinada por la incubación a 37 °C (10, 20, 30, 60 y 120 min) de 0,1 mL de Fg (0,2%) disuelto en buffer Tris HCl 0,05 M pH 7,5 con 20 μl de la enzima purificada. La incubación fue detenida por la adición de buffer muestra PAGE-SDS a la mezcla y posterior calentamiento a 100 °C por 3 min. La actividad fue determinada por PAGE-SDS.

2.2.11. *Liberación de fibrinopéptidos*

Los fibrinopéptidos fueron generados por incubación de 4 μg de la barnetobina con 1 mL de Fg humano (3 mg/mL en 0,05 M de buffer Tris HCl, pH 7,4, conteniendo 0,07 NaCl) a 37 °C por 30 seg, 1, 10, 20, 60, y 120 min. Las componentes insolubles fueron removidos con TCA al 2% y los sobrenadantes fueron sometidos a HPLC en fase reversa sobre una columna analítica (4,6 mm x 25 cm) de Vydac C₁₈ (218TP54) usando una gradiente lineal de acetonitrilo en 0,1 % de TFA (0-15 %, v/v, durante 15 min; después 15-30% durante los siguientes 60 min). Los tiempo de elución de FPA y FPB fueron determinados pasando péptidos purificados (Sigma) a través de la columna.

2.2.12. *Potencia coagulante*

Se determinó por el ensayo de líneas paralelas usando Fg bovino como sustrato para comparar los tiempos de coagulación obtenida con trombina bovina, veneno crudo y enzima purificada. Para tal efecto, se prepararon soluciones iniciales de trombina bovina 5 U/mL, veneno

0,100 mg/mL y enzima purificada 0,060 mg/mL, a partir de las cuales se hicieron diluciones seriadas 1/2, 1/4, 1/8 con NaCl 0,9% (Baughman, 1970).

Las mezclas de reacción contenían 0,2 mL de fibrinógeno 5 mg/mL, 0,1 mL de NaCl 0,9 %. Luego de incubar por tres minutos a 37 °C se adicionó 0,1 mL de la muestra respectiva midiéndose el tiempo de coagulación total. La potencia coagulante fue expresada en unidades NHI equivalentes de trombina que refiere a la cantidad de trombina empleada para coagular el 0,2 mL de Fg en 15 seg.

2.2.13. *Estabilidad frente al pH*

Fue determinada utilizando buffer acetato de sodio 0,2 M para un rango de 4,0 a 6,0, buffer fosfato de sodio 0,2 M para un rango de 6,0 a 8,0 y buffer Tris HCl 0,2 M para un rango de 8,0 a 10,0 empleando 0,1 mL (1 µg) de la enzima midiéndose la actividad amidolítica, coagulante y fibrinogenolítica.

2.2.14. *Estabilidad de la barnetobina a la temperatura*

La tolerancia a la temperatura fue medida utilizando alícuotas de 0,1 mL (1 µg) de la enzima purificada las que fueron colocadas en viales de plástico con tapa por 10 min a 20, 30, 37, 40, 50, 60, 70, 80 y 90 °C respectivamente, para luego ser enfriados bruscamente en una cubeta con hielo. La actividad enzimática fue medida sobre BApNA y plasma humano citratado.

2.2.15. *Susceptibilidad de la barnetobina frente a inhibidores*

Se colocaron en viales pequeños 75 µl de la enzima y 75 µl del inhibidor correspondiente incubándose a 37 °C por 10 min. Luego se tomaron alícuotas de 50 µl de la mezcla realizando el ensayo por triplicado para la prueba de actividad amidolítica con un tiempo de incubación de 15 minutos.

2.2.16. Actividad desfibrinante

Se inyectaron 0,1 mL de la barnetobina en dosis decrecientes, por vía intravenosa en la vena caudal, a 5 grupos de 4 ratones cada grupo. A un grupo adicional de 4 ratones se les inyectó con 0,1 mL de solución salina. Dos horas después de las inyecciones, los ratones fueron anestesiados con cloroformo y mediante punción cardíaca, se obtuvieron aproximadamente 0,2 mL de sangre que fueron colocados en tubos de vidrio e incubados a temperatura ambiente, evitando moverlos. Después de 2 horas de incubación, los tubos se inclinaron cuidadosamente y se observó si se había formado un coágulo o si, por el contrario, la sangre permanecía líquida.

Se determinó la Dosis Desfibrinante Mínima (DDM), la cual corresponde a la dosis de enzima que induce incoagulabilidad en los 4 ratones inyectados (World Health Organization, 1981).

2.2.17. Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA)

El procedimiento fue realizado siguiendo la metodología de Camey et al., 2002 usando diluciones de suero de conejo conteniendo IgG anti TLE de *Lachesis muta* y 0,5 µg de TLEs de *B. barnetti*, *B. leucurus*, *Crotalus durissus terrificus* y de *Lachesis muta muta* diluidos en buffer sodio bicarbonato 50 mM pH 9,6.

2.3. Rol de los carbohidratos asociados

2.3.1. Actividad enzimática

100 µg de la barnetobina fueron sometidos a dseglicosilación bajo condiciones no desnaturalizantes por un periodo de 72 horas a 37 °C, durante este tiempo, el equivalente de 10 µg de proteína fueron retirados y evaluados mediante la actividad sobre el sustrato BApNA en periodos determinados para verificar modificaciones en la actividad enzimática.

Una vez determinado el tiempo de desglicosilación total (48 horas), 25 µg de la enzima deglicosilada fueron utilizadas para determinar su acción bajo diferente pH y temperatura de acuerdo a las metodologías antes mencionadas.

2.3.2. Actividad biológica

El equivalente a 2 DDM de la barnetobina deglicosilada bajo condiciones no denatürantes fueron empleadas para evaluar su capacidad de producir la incoagulabilidad a un grupo de 4 ratones, usando como control positivo la enzima nativa y como control negativo solución salina.

2.3.3. Reconocimiento por el suero antiofídico.

50 µg de la enzima nativa y desglicosilada se analizaron por inmunodifusión e inmunoelectroforesis en geles de agarosa al 1%, de acuerdo a la metodología de Ouchterlony y Nilsson (1967), empleando el suero antibotrópico polivalente obtenido del Instituto Nacional de Salud (INS) de Lima.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Secuencia nucleotídica de la barnetobina

En base a la literatura existente acerca de la obtención de cDNA a partir del RNA total ofídico (Jiménez, 2009; Inga, 2010), en el presente trabajo se logró sintetizar, mediante la transcriptasa reversa, 25 ng/mL de cDNA de un total de 500 µl de veneno fresco extraído por presión mecánica manual de un ejemplar de *Bothrops barnetti*. Generalmente, la obtención de cDNA para el estudio del veneno ofídico se hace extrayendo las glándulas de ejemplares previamente sacrificados (Itoh et al., 1987; Lin et al., 2009; Sant' Ana et al., 2008; Costa et al., 2010). Sin embargo, es posible la obtención de mRNA directamente del veneno recién extraído para este tipo de investigaciones.

A partir del cDNA se obtuvo un amplicón de aproximadamente 750 pb como se muestra en la figura 1. Este amplificado fue obtenido con el empleo de los iniciadores A2-B1 que forman parte del set de 5 iniciadores diseñados y corresponde a la primera mitad del tamaño teórico del gen propuesto por análisis de alineamiento (1400 nucleótidos, anexos 1 y 2).

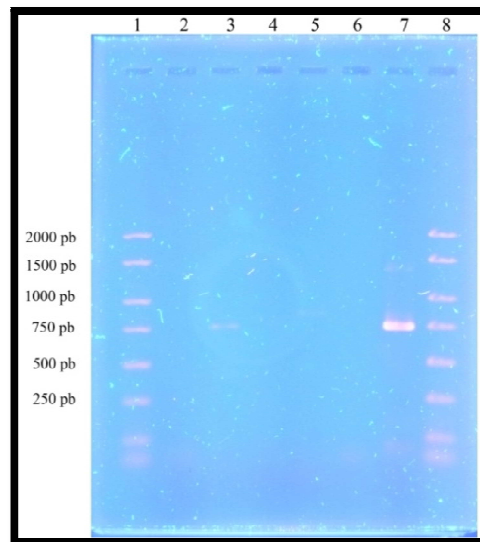


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % del cDNA que codifica a la barnetobina. En los carriles: 1 y 8 marcadores de peso molecular; 2, 4 y 6: Controles negativos para los cebadores A1-B1, A3-B2 y A2-B1; 3, 5 y 7 resultados de la amplificación empleando el orden respectivo de cebadores.

1	atg	ccaaaggaattacaggtttcat	acgcacacaagtc	catctgaa	
	<u>M</u>	<u>P</u>	<u>K</u>	<u>E</u>	<u>L</u>
46	ctgg	tca	ttggaggtgatgaatgtg	acataaatgaaaaa	actttc
	L	V	I	G	G
91	cttg	cattc	ctgtactctcg	cggaatttctgtg	gtttgactttg
	L	A	F	L	Y
136	atca	accaggaatgggtg	ctgac	cgctgcacactgtg	acaggaga
	I	N	Q	E	W
181	tttatg	cccatatac	cttgg	tatacat	accctaagtgtac
	F	M	P	I	Y
226	gatgatg	aggtgataagata	acccaaaggata	attttcattt	gtccc
	D	D	E	V	I
271	aata	ataatataattg	acgaaaaggaca	aggacattatg	ttgatc
	N	N	N	I	I
316	agg	ctgaacagac	ctgtcaaaaac	agtgaacac	atcgccc
	R	L	N	R	P
361	agttt	gccttcca	accttccc	agtggtg	ctcagttt
	S	L	P	S	N
406	atg	ggatggg	gtcaatcacag	ctcctaacg	acactttt
	M	G	W	G	S
451	gtccc	tcattgtg	ctaataac	cctgttcaat	gatacgg
	V	P	H	C	A
496	catgg	agcttacaaa	aggtttcc	ggtgaaaag	cagaacatt
	H	G	A	Y	K
541	gcagg	tgtcctg	caaggagg	caaagataa	atgtatgg
	A	G	V	L	Q
586	ggggg	acccctcat	ctgcaatg	gaccatttc	acggcattt
	G	G	P	L	I
631	tggg	gagatgat	ccctgtg	ccctgccg	cgtaagc
	W	G	D	D	P
676	acca	agggtttg	aatatcccc	cctggatcc	agacattat
	T	K	G	F	E
721	aaaa	atacaactg	agacttg	ccccccg	tga
	K	N	T	T	E

Figura 2. Secuencia nucleotídica del cDNA y la secuencia aminoacídica deducida de la barnetobina obtenida mediante el programa ORF Finder. La parte final del péptido señal se indica en subrayado (aminoácidos 1-11). El péptido de activación se indica por las líneas punteadas (aminoácidos 12 -16) y el resto de la secuencia corresponde a la proteína madura (aminoácidos 17- 249)

El secuenciamiento de este amplificado dio una secuencia de 720 pb cuya composición nucleotídica se indica en la figura 2. En la comparación con otras secuencias de libre acceso mediante BLASTn se determinó que pertenece al grupo de serinoproteasas, obtenidas a partir de mRNA (ver anexo 3) y muestra similitud con las secuencias pertenecientes al género *Bothrops*, con algunas diferencias producto de sustituciones por transversión y transición (figura 3). Los programas ORF Finder y Translate Tool (anexo 4 y 5) dieron un marco de lectura abierta de la secuencia nucleotídica para 249 aminoácidos cuyo análisis será detallado más adelante.

Figura 3. Edición del alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas de cDNA de TLEs por medio de BoxShade. La secuencia del gen de la barnetobina fue alineada con otras enzimas similares a trombina (anexo 3). Los (*) denotan posiciones conservadas. Las letras en azul y negro se señalan los cambios por transiciones y transversiones respectivamente.

Son varios los trabajos en donde se emplea el cDNA para la deducción de la secuencia proteica (Saguchi et al., 2005 y Rujnuckarin et al., 2006), los tamaños de estas secuencias varían dependiendo del criterio de diseño de los cebadores los cuales pueden abarcar no solo las secuencias codificantes sino también, las regiones no traducidas (UTRs) en ambos extremos. Para BjuusuSP-I, TLE de *Bothrops jararacussu*, se sintetizó un cDNA 696 pb con un ORF de 232 aa (Sant' Ana et al., 2008); para Balthernin de *Bothrops alternatus* se sintetizó un cDNA de 708 pb que codifica para una proteína madura de 236 aa (Costa et al., 2010). No obstante, el cDNA de Batroxobin posee un tamaño de 1523 pb cuya región codificante es de solo 765 pb, un resultado similar lo tiene la proteasa A de *Bothrops jararacá* una serinoproteasa cuyo tamaño de cDNA es de 1560 pb pero su ORF es de tan sólo 774 pb que codifica para un pre zimógeno de 258 aa.

Se ha determinado que los transcritos de las serinoproteasas, analizados mediante los cDNA sintetizados, contienen un marco de lectura abierta (ORF) de aproximadamente 820 pb; en estos transcritos los UTR 5' son usualmente cortos mientras que los UTR 3' varían grandemente en tamaño y pueden contener más de 1200 pb (Serrano and Maroun, 2005). Hasta la fecha sólo se cuenta con la secuencia completa del gen de Batroxobina, TLE de *Bothrops atrox*, de una longitud 7923 pb (Itoh et al., 1988) cuyo tamaño de transcrito, analizado por cDNA, es de 1523 pb. Sin embargo, la región codificante para la proteína madura es de 765 pb, su UTR 5' consta de 179 pb y el UTR 3' de 579 pb en donde es característico encontrar la secuencia de 19 nucleótidos de poli A y la secuencia señal putativa de poliadenilación AATAAA (Itoh et al., 1987).

En el presente trabajo se llegó a amplificar un producto de aproximadamente 1500 pb (anexo 6) empleando los cebadores externos A2-B2 que correspondería a toda la secuencia del transcrito propuesto, no obstante, al usar cebadores internos (anexo 1) no se logró amplificar la segunda parte de dicho transcrito, (anexo 6); lo que podría significar una pérdida de información en el extremo carboxilo de la secuencia proteica deducida que a continuación es analizada.

Secuencia Aminoacídica de la barnetobina

Para la deducción de la secuencia proteica de la barnetobina, se empleó el criterio de búsqueda de los ORFs en las 6 posiciones posibles. Un primer análisis con el programa ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) dio como resultado marcos de lectura muy pequeños, esto debido a que el programa encuentra los ORF en base a la ubicación del codón de iniciación (AUG). Por criterio técnico se cambio el primer triplete (GCC) por el de iniciación; en este segundo análisis se obtuvo un ORF que abarcó la totalidad de la secuencia nucleotídica (figura 2, anexo 4). Para confirmar que la secuencia era codificante sin la necesidad del cambio se empleó el programa *Translate Tool* (<http://ca.expasy.org>), que realiza la traducción directa de los tripletes dentro de los 6 marcos de lectura posibles. Al igual que con el primer programa, la lectura con ORF + 1 indicó que toda la secuencia nucleotídica codifica para una proteína de 249 aminoácidos (ver anexo 5) cuya secuencia se muestra en la figura 2.

De acuerdo con la comparación con otras secuencias de TLEs, la proteína deducida consiste de una región de 10 residuos que corresponderían a la parte C-terminal del péptido señal, una región de 6 residuos (H-K-S-S-E-L) que constituyen el péptido de activación indicado para este grupo de proteínas (basados sobre el sitio de procesamiento de pre-péptidos de la serino peptidasas mamíferas, Serrano y Maroun 2005); y por último, una región de 233 aminoácidos que constituyen la proteína madura. Estos resultados son semejantes con otras secuencias proteicas deducidas para las TLEs cuya composición van desde 231 a 236 aminoácidos (Itho et al., 1988; Sant' Ana et al., 2008; Lin et al., 2009 y Costa et al., 2010).

El análisis bioinformático mediante el programa Protparam (<http://ca.expasy.org/tools/protparam.html>), muestra que la secuencia compone una proteína de peso molecular de 27,57 kDa con un punto isoeléctrico de 6,4 que determina el carácter ácido del esqueleto proteico cuya composición de aminoácidos se detalla en la tabla 1. Así mismo, en base a resultados previos sobre la presencia de carbohidratos ligados a la proteína (Vivas et al., 2010) se realizó una búsqueda de motivos de glicosilación cuyos resultados se detallan en la tabla 2.

Tabla 1. Composición aminoacídica de la barnetobina

Aminoácido	%	Cantidad	Aminoácido	%	Cantidad
Ala (A)	5,2	13	Lys (K)	5,6	14
Arg (R)	4	10	Met (M)	1,6	4
Asn (N)	6,8	17	Phe (F)	4,4	11
Asp (D)	6,8	16	Pro (P)	8,8	22
Cys (C)	4,8	12	Ser (S)	5,6	14
Gln (Q)	1,6	4	Thr (T)	4,8	12
Glu (E)	4,	10	Trp (W)	1,6	4
Gly (G)	7,6	19	Tyr (Y)	2,8	7
His (H)	2,8	7	Val (V)	5,2	13
Ile (I)	8	20	Pyl (O)	0	0
Leu (L)	8	20	Sec (U)	0	0

Tabla 2. Motivos encontrados en la secuencia proteica deducida de la barnetobina

TIPO DE MOTIVO	PATRÓN	POSICIÓN
N- Glicosilación	NDTF	129-132
	NDTV	145-138
	NTTE	226-229
Fosforilación (Proteína quinasa II)	TFPD	131-134
Miristilación	GGDECD	3-8
	GNFCGL	22-27
	GVLQGG	166-171

Tres regiones de motivo para N-glicosilación fueron propuestos mediante el programa PIR (protein information resource, <http://pir.georgetown.edu/pirwww/search/pattern.shtml>), estos corresponden a los residuos de asparragina en la posiciones 145, 161 y 242 que siguen el patrón N-X-T/S. Otros motivos encontrados fueron de fosforilación para proteína C quinasa II y de miristilación (tabla 2).

Identificación molecular de la barnetobina

Al igual que con la secuencia nucleotídica se procedió a la identificación de la proteína mediante el programa BLASTp (anexo 7), el cual indicó que la secuencia pertenece a la súper familia de la serinoproteasas similares a tripsina y se encuentra, por criterio de multidominios, dentro de la agrupación de proteínas secretadas con modificaciones postraduccionales al cual pertenecen todas las TLEs estudiadas hasta la fecha (Castro et al., 2004).

La secuencia obtenida a partir del análisis del cDNA fue comparada también con los 20 primeros aminoácidos (VIGGDECDINEHPFLAFLYS) de la región N-terminal obtenida por secuenciación directa de la proteína mediante la técnica de secuenciación automatizada de Edman, solo dos residuos (H→K y P→T) difieren en dicha comparación (error de lectura en el proceso de secuenciación nucleotídica). No obstante, en ambos análisis es congruente la secuencia VIGGDEC que son los primeros aminoácidos de la proteína madura hallada en la mayoría de TLEs como se muestra en la figura 4. La alta homología entre las enzimas coagulantes es confirmada por la presencia del aminoácido V como el primer residuo del N-terminal; una característica común entre las TLEs (Andriao-Escarso et al., 1997).

El alineamiento múltiple de la barnetobina con 10 secuencias de TLEs y otras serinoproteasas conocidas (incluida la trombina, figura 4) mostró características semejantes, siendo una de las mas representativas la presencia de la triada catalítica H₅₇, D₁₀₂, S₁₉₅ (siguiendo la numeración de la quimotripsina), residuos funcionales altamente conservados de las bien caracterizadas serinoproteasas tales como la tripsina y la quimotripsina.

Figura 4. Alineamiento múltiple de la secuencia de la barnetobina (TLE-Bb) con TLEs de diferentes venenos de serpientes, un activador de plasminógeno de *Trimeresurus stejnegeri* (TSV-PA), tripsina y trombina usando el programa CLUSTAL X 1.8. Los símbolos (*) y (.) denotan homología y variación en un aminoácido respectivamente. Los aminoácidos que forman el sitio catalítico están marcados en amarillo; los residuos de cisteína están en anaranjado y en recuadro rojo las regiones S1, S2 y S3 de unión al sustrato. Las abreviaciones son LM-TL (*Lachesis muta*), Ancrod (*Agkistrodon rhodostoma*), Bilineobin (*Agkistrodon bilineatus*), Gyroxin (*Crotalus durissus terrificus*), *Bothrops insularis*, Batroxobin (*Bothrops atrox*), Halystase (*Agkistrodon halys blomhoffii*), Calobin (*Agkistrodon caliginosus*), KN-BJ (*Bothrops jararacá*), *Crotalus adamanteus*, Stejnefibrase-1 (*Trimeresurus stejnegeri*), Bhalternin (*Bothrops alternatus*), BjussuSP-I (*Bothrops jararacussu*), Defibrase (*Agkistrodon acutus*), Flavoxobin (*Trimeresurus flavoviridis*).

La semejanza con la quimotripsina y el orden de los tres residuos catalíticos (H/D/S) coloca a la barnetobina como miembro de la familia de serinoproteasas S1 “clan PA” de las endopeptidasas respectivamente (Barrett y Rawlings, 1995) sugiriendo un mismo plegamiento básico en el dominio catalítico al igual que la tripsina, la quimotripsina y la trombina.

La barnetobina posee 12 residuos de cisteína en posición conservada con el resto de las serinoproteasas; estos aminoácidos estarían involucrados en la formación de puentes disulfuro. En base a la estructura cristalina de TSV-PA, los pares de residuos de cisteínas predichos para la formación de enlaces disulfuro serían C₂₂-C₁₅₇, C₄₂-C₅₈, C₉₁-C₂₅₀, C₁₃₆-C₂₀₁, C₁₆₈-C₁₈₂ y C₁₉₁-C₂₂₀. Serrano y Maroun (2005), mencionan que los pares de puentes disulfuro 1, 2, 3, 5 y 6 se encuentran en homología con la tripsina y el par 4 estaría restringido para las serinoproteasas de los venenos ofídicos por la presencia del residuo C₂₅₀ en el extremo C-terminal de las TLEs y que esta ausente en la tripsina (figura 4).

Tomando como modelo al activador del plasminógeno de *Trimeresurus stejnegeri* (TSV-PA) se ha propuesto la estructura tridimensional de la barnetobina (figura 5A), la cual sigue el típico plegamiento β/β hidrolasa que poseen las enzimas similares a tripsina (Sant' Ana et al., 2008). Las regiones circundantes al sitio catalítico son bien conservadas para todas las TLEs, no obstante, la superficie es ampliamente diversa en forma debido a la variada presencia y longitud de loops estructurales (figura 5B).

Esta variación podría jugar un rol importante en la actividad y especificidad de las TLEs como está descrito para las serinoproteasas de mamíferos (Krem y Di Cera, 2000). Un hecho interesante se da en los aminoácidos que rodean a la serina del sitio activo a los que se les atribuye la especificidad de sustrato, en la barnetobina esta región tiene la secuencia GDSGGP que es compartida con la trombina y la tripsina. Sin embargo, las secuencias de *Ancrod®* y flavoxobin son SDSGGP y FDSGTP; en todos los casos el residuo D, seis aminoácidos antes de la S, se mantiene conservado por ser el responsable de la unión al sustrato en este tipo de proteasas (Oyama y Takahashi 2002).

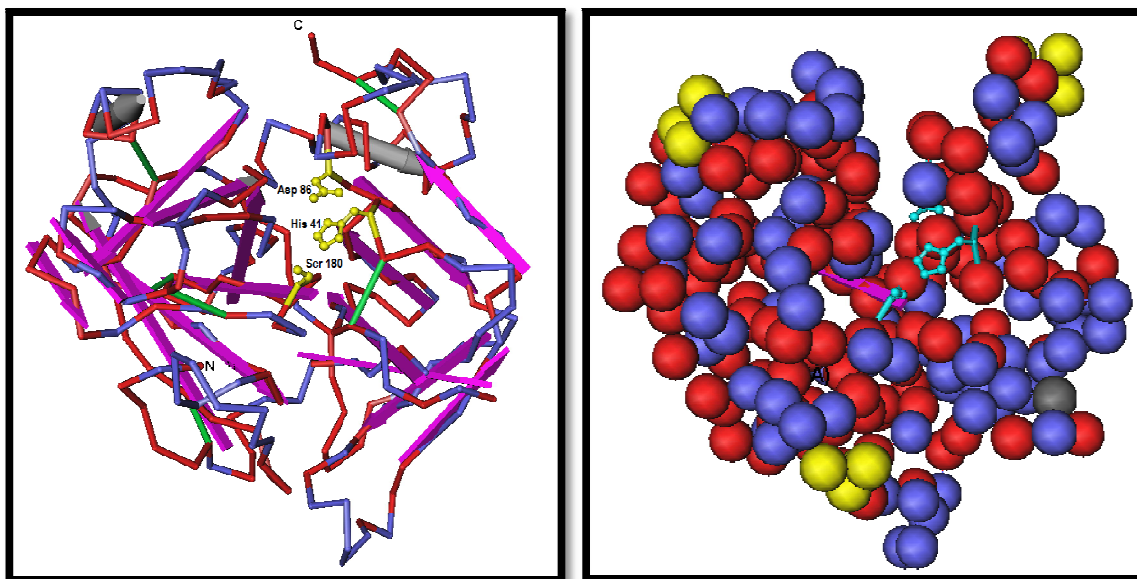


Figura 5A. Modelo teórico para la estructura tridimensional de la barnetobina obtenidos por el programa Cn3D. La estructura fue obtenida mediante la comparación con la secuencia del activador de plasminógeno de *Trimeresurus stejnegeri* (TSV-PA). En rojo, se muestran los residuos conservados, en azul los residuos diferentes. *Izquierda* en amarillo los tres residuos que forman triada catalítica. En verde los puentes disulfuro. En lila, lámina β y en plomo, hélice α . Las letras N y C indican los extremos amino y carboxilo respectivamente. *Derecha* en turquesa los residuos que conforman la triada catalítica, en amarillo ubicación de los motivos de glicosilación.

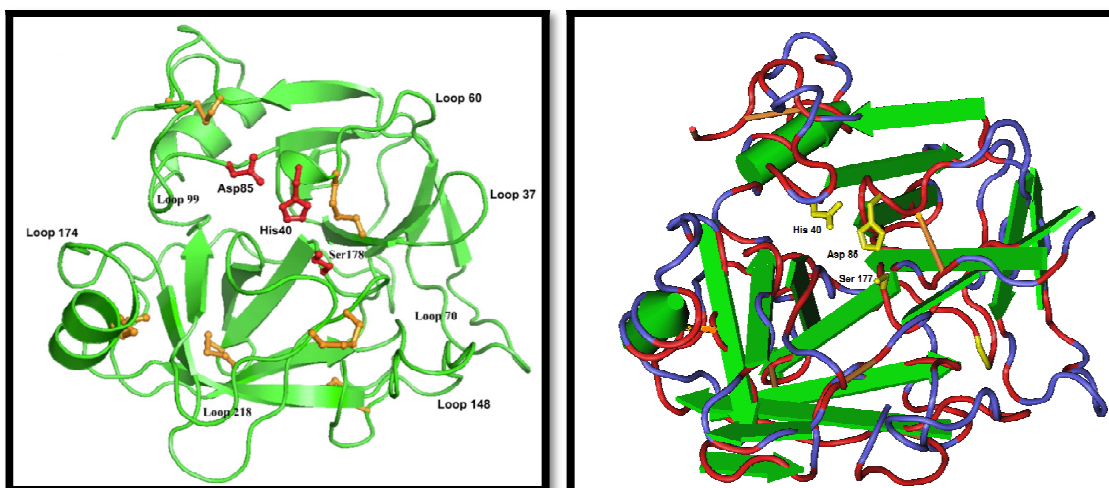


Figura 5B. Comparación de los modelos teoricos de BjussuSP-I (TLE de *Bothrops jararacussu* generado por PYMOL. Sant' Ana et al., 2008) y la Barnetobina (generado por Cn3D) respectivamente. Se muestra una semejanza en el plegamiento β/β hidrolasa. La presencia de algunos loops es variable en ambos modelos en cuanto disposición y posición

Análisis estructura-funcional de la actividad similar a trombina de la barnetobina.

La barnetobina fue purificada mediante la metodología descrita anteriormente (Vivas et al., 2010) con algunas modificaciones (ver sección de metodología, los resultados se muestran en los anexos 8, 9, 10, y 11). La enzima se presenta como una sola banda proteica cuya masa molecular (analizado por PAGE-SDS) es de 52 kDa, en condiciones reductoras, y de 48 kDa en condiciones no reductoras (figura 6), la diferencia de estos datos es debido al desplegamiento que la proteína realiza por la reducción de los puentes disulfuro por parte del agente 2 β -mercaptoetanol.

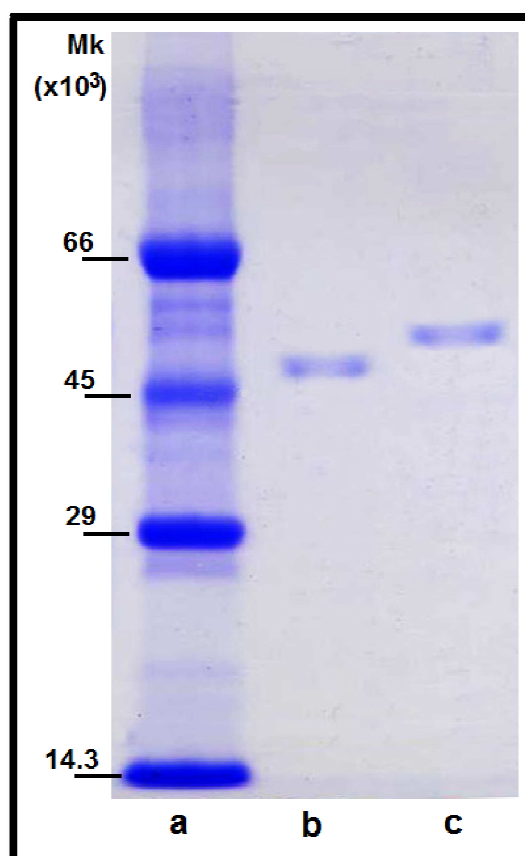


Figura 6. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS). En **a)** marcadores de masa molecular: Albúmina Sérica Bovina (66 kDa), Ovoalbúmina (45 kDa), Anhidrasa Carbónica (29 kDa) y Lisozima (14,3 kDa). En **b)** la barnetobina en condiciones no reductoras y **c)** bajo condiciones reductoras.

Hasta la actualidad, la mayoría de TLEs son proteína monoméricas con masas moleculares que varían desde los 26 a los 67 kDa, dependiendo de su contenido de carbohidratos. Una excepción es brevinasa, una enzima de dos cadenas heterogéneas aislada del veneno de *A. blomhoffii brevicaudus* (Lee et al., 1999), en la cual los puentes disulfuro unen dos cadenas polipeptídicas (16,5 y 17 kDa). Sin embargo, el cDNA sugiere que la proteína es sintetizada como una sola cadena polipeptídica. Otra excepción corresponde a RP-34 del veneno de *Cerastes cerastes* compuesta por dos homodímeros de 48,5 kDa (Larba-Djabari et al., 1992).

El mecanismo de acción de las TLEs consiste básicamente en dos pasos de reacciones de acilación, en la que se rompe el enlace peptídico formándose un enlace éster entre el carbono carbonílico del péptido y la enzima, y desacilación, en la que el enlace éster se hidroliza regenerándose la enzima. El nucleófilo que interviene en la etapa de acilación es el oxígeno de la serina el cual ataca el carbono carbonílico del enlace peptídico, la histidina unida por un puente de hidrógeno funciona como una base general que capta el protón de la serina mientras que el aspartato, cargado negativamente estabiliza la carga positiva que se forma sobre el residuo de histidina. Esto impide la formación de una carga positiva muy inestable sobre el hidroxilo de la serina al tiempo que incrementa su nucleofilicidad. La histidina también puede actuar como dador de protones para protonar el grupo amino en la parte desplazada del sustrato. En la fase de desacilación ocurre un proceso de transferencias similares (Lehninger et al., 2001).

La enzima posee actividad coagulante sobre el Fg bovino degradando la cadena A α en una función tiempo-dependiente como se muestra en la figura 7. La potencia coagulante sobre el Fg fue de 257,1 NIH unidades de trombina y la dosis coagulante mínima (DCM) fue de 0,9 μ g. La barnetobina también coagula el plasma humano citratado con una DCM de 1,1 μ g, dicha acción es llevada a cabo liberando el fibrinopéptido A (FPA) (figura 8). Esta característica catalítica ubica a la barnetobina dentro del grupo de las *venombinas A* junto con la TLE de la serpiente peruana *Bothrops atrox* (Sandoval et al., 2010).

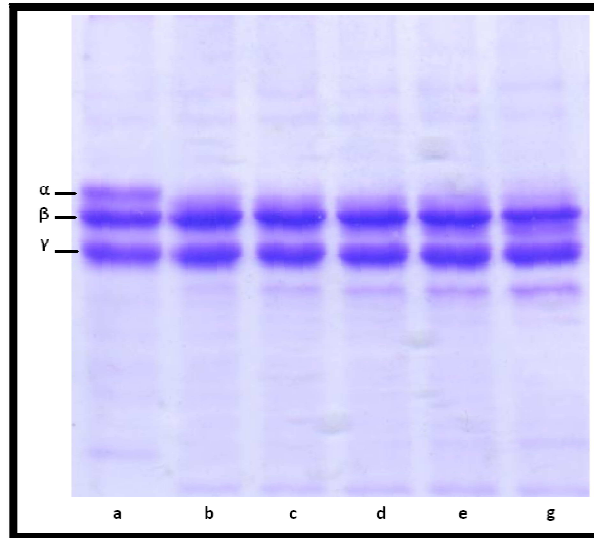


Figura 7. Actividad fibrinogenolítica de la barnetobina sobre fibrinógeno bovino: control (a), en diferentes intervalos de tiempo, 10 min (b), 20 min (c), 30 min (d), 60 min (e) y 120 min (g). Las letras α , β , y γ representan las cadenas de la molécula de fibrinógeno.

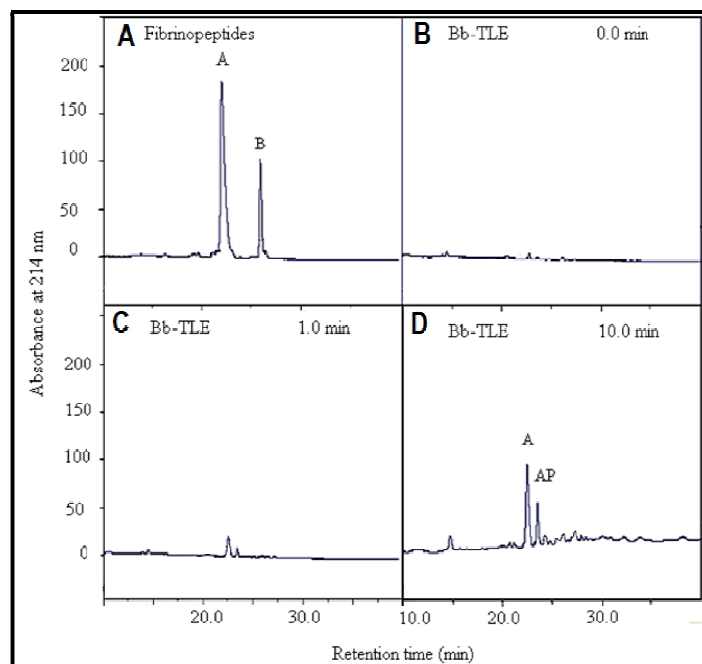


Figura 8. Perfiles de elución por HPLC en fase reversa de la liberación de péptidos de fibrinógeno humano por acción de la barnetobina en función del tiempo. a) estándares de fibrinopeptidos A y B, c-d) liberación en función del tiempo de los fibrinopéptidos. Abreviaciones: (AP) forma fosforilada del fibrinopéptido A, (Bb-TLE) *Bothrops barnetti*- Thrombin like enzyme.

La barnetobina libera el FPA debido a que actuaría sobre el enlace peptídico R₁₆-G₁₇ de la cadena A α del fibrinógeno (Silva y De Simone, 2004; Magalhaes et al., 2007) produciendo una degradación del mismo como se demuestra en el ensayo fibrinogenolítico (figura 7). Desde un punto de vista fisiológico, este sólo fibrinopéptido liberado no es suficiente para darle estabilidad a la malla de fibrina resultante la cual es rápidamente degradada por procesos fibrinolíticos secundarios disminuyendo de esta manera los niveles de fibrinógeno endógeno en el sistema sanguíneo (Stocker et al., 1982), este hecho sería el fundamento por el cual la barnetobina produjo la incoagulabilidad sanguínea en el ensayo desfibrinante medido en modelo murinos (DDM= 0,05 mg de la enzima /kg de peso de ratones).

Las TLEs son agrupadas de acuerdo a la capacidad que tienen de liberar el FPA (*venombina A*) ó el FPB (*venombinas B*) o ambos (*Venombinas AB*) de las moléculas de fibrinógeno (Markland, 1998), en tanto que la multifuncional trombina libera ambos fibrinopéptidos debido a la presencia de dos sitios hidrofóbicos de reconocimiento denominados ABE-I y ABE-II (anion binding exosites; Stubbs y Bode 1993; Banfield et al, 1992). En la trombina, ABE-I es el sitio clave para el reconocimiento molecular y consiguiente catálisis de sus sustratos naturales, esta región está ausente en la barnetobina (y en las demás TLEs) a la igual que la región ABE-II, que es el sitio de unión de glucosaminoglucanos tales como la heparina (Castro et al., 2004). La interacción que tienen las TLEs, y por ende, la barnetobina, sobre el fibrinógeno es debido a la presencia de regiones catiónicas homólogas a ABE-I que abarcarían los residuos de R_{60, 81, 82, 107, 119 y 113} y K_{73, 76, 85 y 87}; la variabilidad en estas posiciones determinan la forma y la potencia de clivaje sobre el Fg.

Por otro lado, el uso de sustratos cromogénicos (tabla 3) que limitan la especificidad catalítica de una enzima, ha demostrado que la barnetobina tiene actividad sobre los enlaces que forma la arginina en las moléculas sintéticas tales como el BApNA (sustrato para serino proteasas) y Chromozyn TH (sustrato específico para la trombina), evidenciando la actividad arginil ester hidrolasa propia de las TLEs. Asimismo, la actividad esterásica medida sobre los sustratos TAME y BAAE amplía la capacidad catalítica de la enzima, y esto se debe fundamentalmente, a que la

Tabla 3. Actividades enzimáticas de la barnetobina de *Bothrops barnetti*

Sustrato	pH	Actividad Específica* (UA/ mg de proteína)		Incremento de Actividad (veces)
		Veneno	Barnetobina	
TAME	7.4	4,64 ± 0,90	118,82 ± 3,5	25,6
BAEE	7.4	1,96 ± 0,7	57,16 ± 1,8	29,16
BAPNA	8.0	0,02 ± 0,003	1,05 ± 0,02	45
Chromozym TH	8.3	0,81 ± 0,04	10,6 ± 0,9	12

*Promedio ± SD, n=3

enzima posee regiones de especificidad primario S1 y secundario S2 (en la barnetobina, D y G respectivamente) los cuales garantizan la interacción con los residuos básicos P1 de los sustratos antes mencionados (Castro et al., 2004). Sin embargo, la presencia del residuo de A₁₉₀ en el sitio de especificidad terciario (S3) podría limitar la acción catalítica sobre aquellos sustratos que poseen al residuo P como punto de clivaje en la posición P2.

Interacción de la barnetobina con algunos inhibidores

En la figura 9 se muestra el efecto que tienen algunos inhibidores de proteasas sobre la acción amidolítica de la barnetobina los cuales permiten determinar y/o reforzar las características principales de la enzima purificada como parte del grupo de las TLEs.

El esperado efecto inhibitorio del PMSF confirma la presencia de serina en el sitio activo de la enzima. El PMSF fosforila el grupo hidroxilo de esta serina evitando que este último realice el ataque nucleofílico sobre el sustrato. El inhibidor de tripsina de soya también mostró inhibición debido a que forma un complejo con la enzima impidiendo la interacción con el sustrato, este modo de inhibición es semejante en todas las TLEs debido a la similitud con la tripsina en el dominio catalítico. Sin embargo, el TLCK, agente que modifica a los residuos de histidina, no tuvo efecto inhibitorio como lo tiene con todas las enzimas similares a tripsina, esto es debido a la especificidad de sustrato de la barnetobina el cual tiene mayor afinidad hacia la arginina que a la lisina (Itoh, 1987). Asimismo, los resultados obtenidos con el agente quelante EDTA muestra que la barnetobina no precisa regulación alostérica por cationes como si sucede con la tripsina (Castro, et al., 2001). Este resultado se da

por la presencia conservada de un residuo P₂₂₅ que reemplaza a la Y₂₂₅ (presente en la trombina) resultando en una pérdida de discriminación entre cationes monovalentes, por consiguiente, ausencia de regulación alostérica.

De acuerdo a la información literaria, existe íntima relación entre la H₅₇, D₁₀₂, S₁₉₅, los cuales permite el clivaje del sustrato, que se debe principalmente a la disposición espacial que tienen estos residuos gracias a la conformación β/β hidrolasa predicha para el grupo de la TLEs, toda la arquitectura de la proteína es mantenida por la presencia de los puentes disulfuro (figura 5A). La inhibición de la barnetobina por parte del agente DTT corrobora la presencia de los 6 enlaces disulfuro determinados en la secuencia aminoacídica y que estos, contrario a lo que se menciona en la investigación previa (Vivas, et al., 2010), tienen mucha importancia en la disposición de la triada catalítica para efectuar la acción sobre el sustrato. Los resultados obtenidos con el iodoacetato, evidencian que los 12 residuos de C estarían formando los enlaces mencionados ya que no hubo efecto inhibitorio alguno por parte de este agente cuya acción se centra en su unión a los grupos tiólicos libres de las Cys que no se encuentren participando en la formación de enlaces.

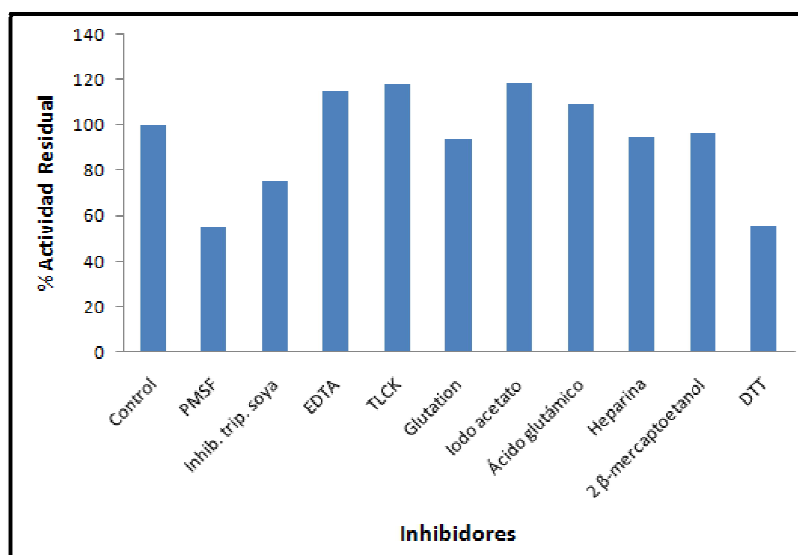


Figura 9. Inhibición de la actividad amidolítica por inhibidores de proteasas. La barnetobina fue preincubada 30 minutos. La concentración final de los inhibidores fue de 5 mM excepto para Heparina (5 unidades) y el Inhibidor de tripsina de soya (1 mg/mL). Las barras representan el valor promedio obtenido (n=3).

El 2 β mercaptoetanol no mostró un efecto inhibitorio significativo pese a que si logró reducir a la proteína como fue evidenciado en PAGE-SDS (figura 6); resultado similar fue obtenido para el glutatión, otro agente reductor de puentes disulfuro, lo que indica que ambos agentes no llegarían ingresar al esqueleto proteico de una manera mas eficiente como si los hace el DDT. El ácido glutámico, contrario a los resultados obtenidos para la TLE de *Lachesis muta* (Yarleque, 1987) no inhibió la actividad amidolítica de la barnetobina, la acción por el cual este aminoácido puede causar inhibición no es bien entendida hasta la fecha.

Una de las características más resaltantes de las TLEs es su insensibilidad ante la heparina, razón por la cual este grupo de enzimas son utilizadas en farmacología para analizar muestras de sangre heparinizadas (Stocker 1990). La heparina es un inhibidor principal de la trombina, este efecto yace en la unión de este glucosaminoglicano a la regiones ABE II de la trombina para formar los complejos heparina-antitrombina III-trombina impidiendo de esta manera la acción de esta ultima sobre las moléculas de fibrinógeno. La barnetobina no fue inhibida por heparina debido fundamentalmente a la carencia en su estructura proteica de las región ABE II y ABE I (figura 4). La antitrombina y la hirudina tampoco pueden inhibir la acción de la mayoría de las TLEs bajo el mismo principio de la heparina (Pirkle, 1988).

Rol de la N-Glicosilación

Los carbohidratos asociados a la barnetobina

La arquitectura de las proteínas esta en función a las actividades que éstas han de cumplir, la mayoría de estas macromoléculas son sometidas a modificaciones pos-traduccionales que les han de permitir realizar de una manera eficiente, las actividades para la cual han sido ensambladas.

Quizás una de las características más sobresaliente de la barnetobina es su estabilidad enzimática ante los cambios de temperatura y pH. La actividad coagulante, amidolítica y fibrinogenolítica se mantienen presentes en el rango de pH 3,0 a 9,0; y también por encima del 50% hasta una preincubación a 60 °C (figura 10 y

11). La base fisiológica para este comportamiento se entiende por la razón de que la proteína realiza su actividad catalítica en un ambiente totalmente distinto al lugar en donde fue producida, es decir, la barnetobina es producida en medio ácido que le da las glándulas exocrinas del animal poiquilotermo y trabaja en un medio básico muy dinámico que es el sistema sanguíneo de su presa endotérmica.

En el 2010, Vivas et al., reportaron que la estabilidad de la barnetobina es debida a la presencia de carbohidratos asociados al esqueleto proteico. Los resultados de deglicosilación obtenidos en el presente trabajo (figura 12) determinan que la barnetobina posee sólo la glicosilación del tipo N-linked que equivale al 48% de la masa molecular de la proteína y da soporte a la presencia de los tres motivos de N-glicosilación en la secuencia de la proteína. Los resultados de la determinación de tipos de carbohidratos muestran que la enzima posee un contenido de carbohidratos expresados en 27,65% de hexosas, 11,34% de hexosaminas y 0,99% de ácido siálico que representan un total 39,98 % de azúcares asociados a la enzima.

Es conocido que las TLEs son glicoproteínas cuyo contenido de carbohidratos puede llegar hasta un 36% (Pirkle, 1998 y Castro, et al., 2004). Sin embargo, otras serinoproteasas pueden sobrepasar más del 50% en su contenido de carbohidratos como es el caso de la proteasa A de *Bothrops jararaca* (Muruyama et al., 2003) cuyo contenido de carbohidratos llega hasta el 60% de su masa molecular. Existe evidencia considerable que la mayoría de carbohidratos asociados a las TLEs, y en algunos casos la totalidad, están asociados al aminoácido D, lo que establece una glicosilación del tipo N-linked (Silva-Junior et al., 2007).

La N-glicosilación sucede a nivel del retículo endoplasmático por una unión β -glucosídica vía GlcNAc, (N acetil glucosamina) sobre el grupo amida de la asparragina en el motivo N-X-S/T (algunas veces también C) (Vance et al., 1997; Satomi et al., 2004). Estos procesos de glicosilación particularmente, en los eucariotas, han incrementado la capacidad de secretar glicoproteínas en diversas cantidades; el núcleo pentasacárido, el cual está constituido por $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, puede ser dividido en tres clases dependiendo del tipo de unión de los monosacáridos al núcleo (Helenius y Aebi, 2001); a partir de ello, se pueden

estructurar diversos patrones de adición de carbohidratos, llegando a alcanzar hasta 15 estructuras diferentes en una misma TLE como es el caso para Batroxobin de *Bothrops moojeni* (Lochnit and Geyer 1995). Esta característica es responsable de la microheterogeneidad de este grupo de enzimas (Magalhaes et al., 2007, Petretski et al., 2000).

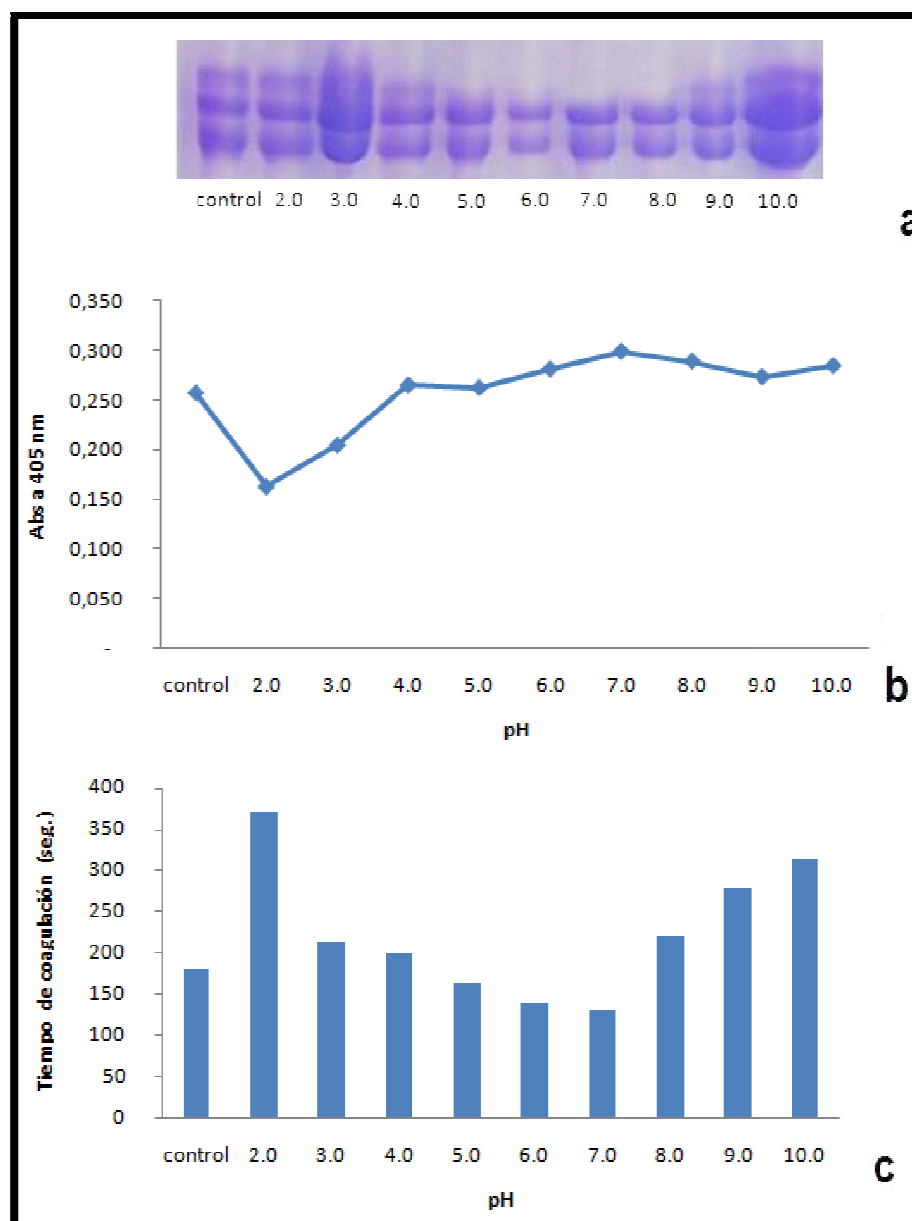


Figura 10. Actividades enzimáticas a diferentes pH. La barnetobina fue preincubada por 30 min en un rango de pH de 2,0 a 10,0. **a)** Actividad fibrinogenolítica sobre fibrinógeno bovino; **b)** Actividad amidolítica sobre sustrato BApNA y **c)** Actividad coagulante sobre plasma humano citratado (valores promedio, n=3).

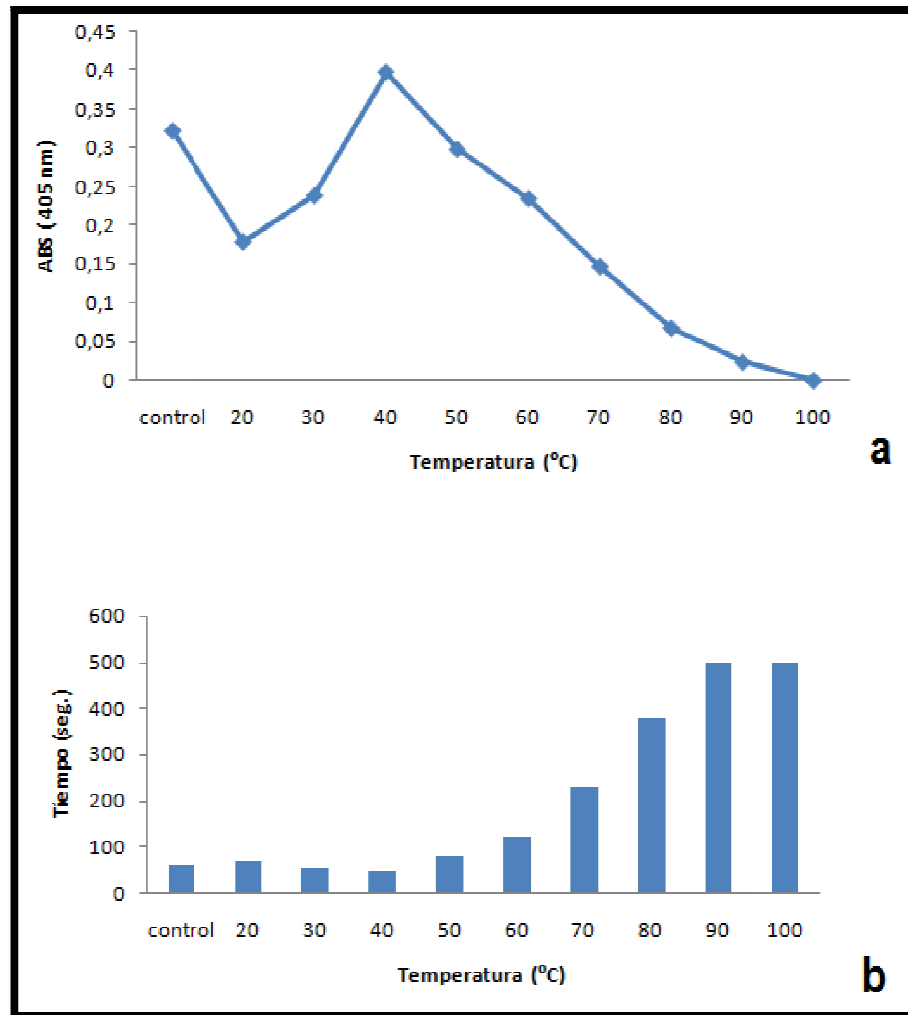


Figura 11. Actividades enzimáticas a diferentes de temperaturas. La barnetobina fue preincubada por 30 min entre 20 a 100 °C. **a)** Actividad amidolítica sobre sustrato BApNA y **b)** Actividad coagulante sobre plasma humano citratado (valores promedio, n=3).

La PNGasa F, es una glicosilasparraginasa recombinante que rompe los enlaces entre la asparragina no terminal y los azúcares asociados a este, desaminando de esta manera a la asparragina y dejando el oligosacárido intacto (Norris, 1994). El análisis de carbohidratos en las TLEs tratadas con PNGasa F han permitido evaluar el diferente porcentaje de la N-glicosilación; *B. jararacussu* 42%, *B. leucurus* 20%; *A. saxatilis* 28% y *Lachesis muta muta* 38% (Silva-Junior et al., 2007; Magalhaes et al., 2007; Koh, et al., 2001; Magalhaes et al., 2003).

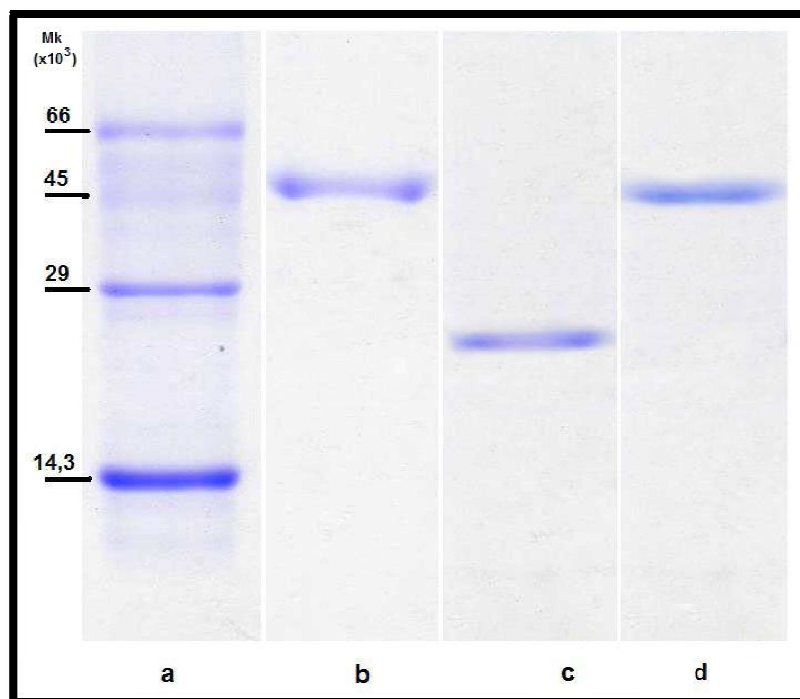


Figura 12. Desglicosilación de la barnetobina analizada por PAGE-SDS. En a) marcadores de masa molecular, b) enzima en condiciones reductoras c) enzima tratada con PNGasa F y d) enzima tratada con O-glicosidasa.

El rol de los carbohidratos asociados

La barnetobina fue desprovista de sus carbohidratos, mediante tratamiento no desnaturizante con PNGasa F, y evaluada su actividad amidolítica con respecto al tiempo (figura 13) y a diferentes pH y temperaturas (figura 14 y 15 respectivamente).

La enzima perdió considerable estabilidad a los valores extremos, manteniendo una máxima actividad a pH 7,0 la cual es equivalente al 50 % de la máxima actividad de la enzima nativa; a pHs ácidos y alcalinos la enzima perdió prácticamente la totalidad de su actividad. Un comportamiento similar se presentó, en los ensayos a diferentes temperaturas, a los 50 °C la enzima redujo en más del 50 % su actividad amidolítica; a la temperatura óptima de 40 °C, la actividad de la enzima desglicosilada representa sólo el 60 % de la actividad original (figura 15).

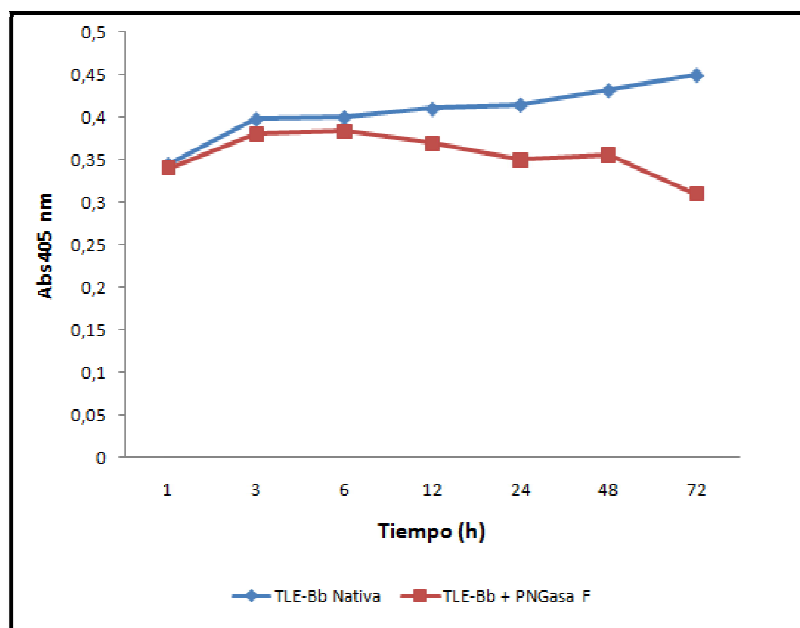


Figura 13. Ensayo enzimático para la determinación de la función de los carbohidratos. La barnetobina fue incubada con PNGasa F (línea roja) sin agentes denaturantes a 37 °C; alícuotas de la mezcla fueron colectadas a intervalos de tiempo determinados para ser probadas su acción sobre el sustrato BApNA. En paralelo la misma cantidad de enzima nativa fue evaluada bajo los mismos parámetros (línea azul) (valores promedio, n=3).

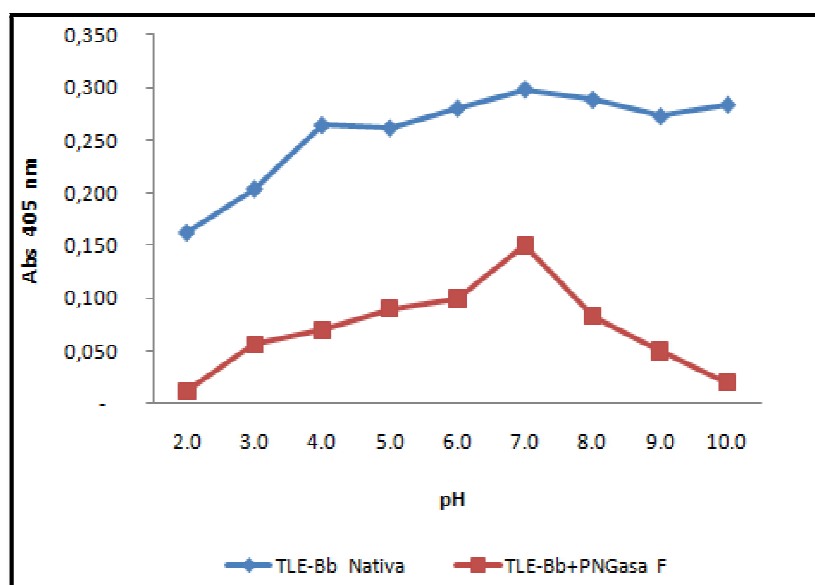


Figura 14. Ensayo enzimático para la determinación de la función de los carbohidratos ante los cambios de pH. La barnetobina nativa previamente digerida con PNGasa F (sin agentes reductores) fue incubada con BApNA; para la evaluación de su actividad amidolítica (valores promedio, n=3).

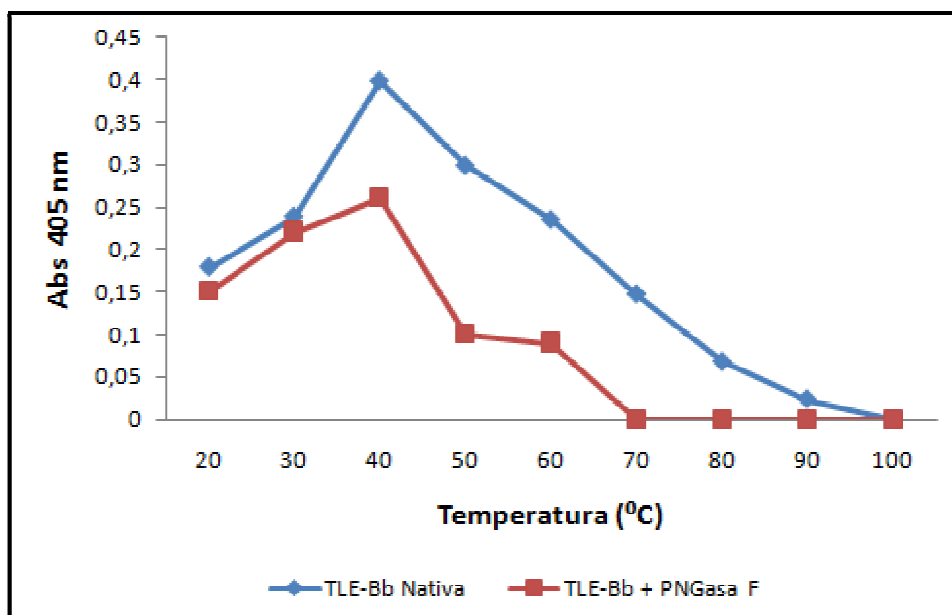


Figura 15. Ensayo enzimático para la determinación de la función de los carbohidratos ante los cambios de temperatura. La barnetobina nativa previamente digerida con PNGase F (sin agentes reductores) fue incubada con BApNA; para la evaluación de su actividad amidolítica (valores promedio, n=3).

Múltiples roles han sido asignados a los oligosacáridos N-ligados, principalmente afectan el plegamiento y la estabilidad de las proteínas en el retículo endoplasmático por efectos entrópicos mas que entálpicos; es propuesto que los carbohidratos reducen el desorden del estado desplegado de una proteína y mantienen la temperatura de *melting* con respecto al estado plegado de la misma (Imperiali y O'Connor 1991). Otras participaciones se dan en la protección de la degradación por proteólisis y la modulación de las propiedades fisiobioquímicas y las actividades biológicas e inmunológicas (Helenius y Aebi 2001, 2004; Fares, 2006). Los trabajos de Zhu et al. (2005) y Sant'Ana et al. (2008) establecen que los azúcares asociados están relacionados a la resistencia catalítica de las TLEs cuando es sometida a diferentes valores de temperatura y de pH; los carbohidratos podrían promover la estabilidad del sitio catalítico dirigiendo el replegamiento de la proteína después de la desnaturalización.

Para la barnetobina la deglicosilación produjo una pérdida de estabilidad a valores extremos de pH y temperatura lo que indicaría que la enzima se vuelve susceptible a cambios en su estructura terciaria en tales condiciones. De la misma forma, hay una reducción de actividad en los valores óptimos que evidencian una participación de los carbohidratos en la interacción con el sustrato. La actividad *in vivo* también se vio severamente afectada ya que la inoculación del equivalente a dos DDM de la barnetobina deglicosilada no tuvo efecto alguno sobre los tiempos de coagulación siendo estos semejantes al grupo control con solución salina, otro resultado interesante se obtuvo cuando se enfrentaron la proteína deglicosilada con el suero antiofídico, donde no se llegó a evidenciar banda alguna de reconocimiento. Datos puntuales señalan que los carbohidratos confieren una estabilidad térmica y protección contra los inhibidores para BJ-48 (TLE de *Bothrops jararacussu*) y para proteasa A (*Bothrops jararacá*) y permiten una mejor estabilidad catalítica para la BpSP-1 (*Bothrops pauloensis*) (Silva-Junior et al., 2007; Magalhaes et al., 2007; Costa et al., 2009).

La diversidad catalítica y la microheterogeneidad de las TLEs

Desde un punto de vista estructural, las TLEs pertenecen a un grupo cercanamente relacionado a la quimotripsina mas que a tripsina y trombina (Castro et al., 2004). Todos los resultados mostrados son evidencias claras que no hay una semejanza estructural notoria con la trombina. Al realizar un análisis filogenético entre las secuencias utilizadas en la figura 4 se refuerza lo dicho anteriormente (figura 16), todas las TLEs forman un cluster concreto y separado de las serinoproteasas mamíferas. No obstante, la semejanza estructural dentro del grupo de las TLEs no obedece a la cercanía taxonómica de las especies que la contienen y tampoco refleja la diversidad de actividades que realizan. Una explicación a esta diversidad catalítica esta dada por los eventos de duplicación génica, mutaciones puntuales aceleradas (Deshimaru et al., 1996) y los eventos de cambios acelerados de segmentos en los exones, recientemente conocidos como ASSET (Accelerated Segment Switch in Exons to alter Targeting, Doley et al., 2009) los cuales pueden

conferir nuevas funcionalidades farmacológicas sobre plegamientos moleculares conservados, lo cual es común entre las proteínas del veneno.

Desde un punto de vista inmunológico, la semejanza en la estructura primaria de las TLEs de dos especies distintas, no se comportan antigénicamente igual, datos obtenidos usando anticuerpos anti TLE de la serpiente *Lachesis muta* (figura 17), pone en evidencia que la supuesta cercanía estructural entre *Bothrops barnetti* y *Bothrops leucurus* no es útil para establecer su semejanza antigénica, la razón fundamental para este hecho se debe al distinto grado de glicosilación que ambos deben tener y que obviamente es característico de la microheterogeneidad descrita anteriormente. Si se quiere dar un refuerzo desde el punto de vista fisio-inmunológico en algunos casos los carbohidratos puede mimetizar a la proteína dentro de un sistema distinto al de su origen, un mecanismo protector contra los inhibidores de serinoproteasas de las presas naturales de las serpientes; lo que permitiría incrementar el tiempo de vida media efectivo en los tejidos de la presa e incrementar la probabilidad de disminuir los niveles de fibrinógeno. Basado en estas propiedades dos TLEs, *batroxobin* y *Ancrod®*, son intercalados en los tratamientos terapéuticos; ya que no presentan reacción cruzada debido al distinto patrón de glicosilación que poseen.

Se establece entonces que las características peculiares estudiadas en la barnetobina responden a la forma como esta proteína está diseñada; la estructura de esta enzima similar a trombina le permite alcanzar su performance óptima en el veneno de *Bothrops barnetti* el cual consiste en degradar, en forma rápida y con efecto permanente, todo el fibrinógeno circulante de la presa para posteriormente permitir la extravasación de la sangre mediante el accionar de otras enzimas proteolíticas que, finalmente, conlleven a la muerte de la misma. Todos los datos presentados intentan dar sentido a la relación estructura función de la enzima para poder colocarla dentro de la perspectiva terapéutica junto con otras proteínas de su mismo tipo que ya están siendo empleadas en el campo clínico.

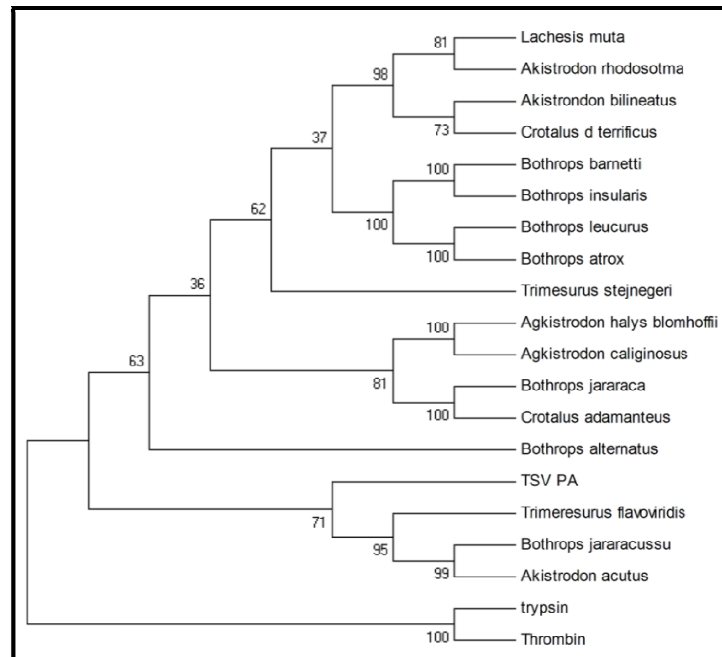


Figura 16. Árbol de relación entre algunas TLEs y SVPS elaborado mediante el programa MEGA 4.1 empleando el modelo de Neighbor-Joining con un valor de bootstrap de 1000 replicas. La barnetobina forma un cluster con las demás TLEs del mismo género lo que evidencia un origen común. Las secuencias utilizadas son aquellas que se muestran en la figura 4.

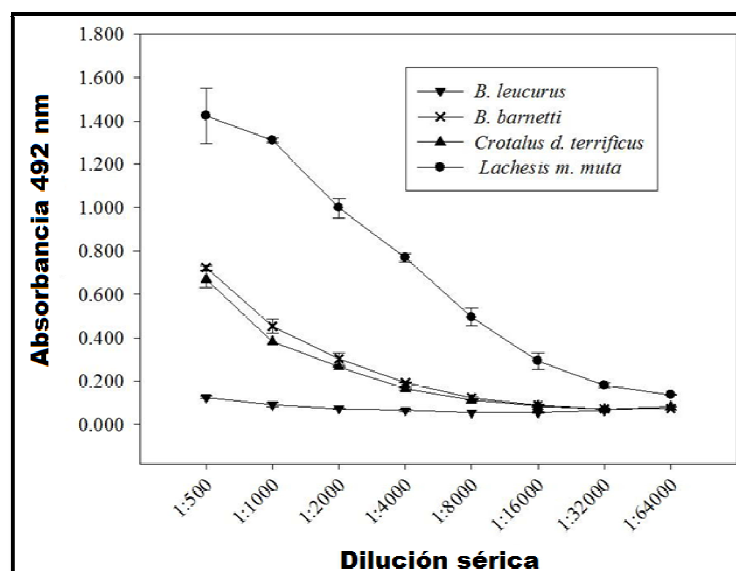


Figura 17. Reactividad de algunas TLEs frente al los IgG anti TLE de *Lachesis muta muta*. Se muestra un comportamiento antigénico distinto entre las TLEs de venenos vipéridos. Los valores dados son el promedio de triplicados.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos del análisis molecular, bioquímico y funcional se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1. La barnetobina, enzima similar a trombina del veneno de *Bothrops barnetti*, es una serinoproteasa perteneciente a la familia S1 clan PA a la cual pertenece la tripsina, la quimotripsina y trombina.
2. Los estudios *in silico* muestran que la región codificante de la barnetobina tiene 720 nucleótidos que codifica una proteína madura de 233 aminoácidos con motivos para N-glicosilación.
3. Estructuralmente, la barnetobina es una glicoproteína unicitenaria ácida con plegamiento β/β hidrolasa estabilizada por enlaces disulfuro que muestra una significativa similaridad en términos de peso y secuencia N terminal con otras enzimas similares a trombina.
4. Funcionalmente, la barnetobina es una enzima defibrinogenante con actividad arginil ester hidrolasa miembro del grupo de las venombinas A de las enzimas similares a trombina.
5. Los carbohidratos asociados a la barnetobina le confieren estabilidad catalítica y modulan su unión al sustrato; asimismo, son responsables de la microheterogeneidad y el carácter antigénico de la enzima.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL SF, MADDEN TL, SCHÄFFER AA, ZHANG J, ZHANG Z, MILLER W, LIPMAN DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1;25(17):3389-402

ANDRIÃO-ESCARSO SH, SAMPAIO SV, CUNHA OA, MARANGONI S, OLIVEIRA B, GIGLIO JR. 1997 Isolation and characterization of a new clotting factor from *Bothrops jararacussu* (jararacuçu) venom. *Toxicon.* 35(7):1043-52.

ASCENCIOS H, CUTTI F, 1995. Distribución geográfica de la fauna ofídica ponzoñosa en el Perú. *Bol. Lima* N° 97, pp.91-96.

BANFIELD DK, MAC GILLIVRAY RTA. 1992. Partial characterization of vertebrate prothrombin cDNAs: amplification and sequence analysis of *b*-chain of thrombin from nine different species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2779–2783.

BARRETT AJ, RAWLINGS ND. 1995. Families and clans of serine peptidases. *Arch Biochem Biophys.* 20;318(2):247-50.

BAUGHMAN, DJ 1970. Thrombin assay, In: *Methods in enzymology, proteolytic enzymes.* G.E. Periman & L. Lorand Eds. Academic Press. New York-London 19: 145-157.

BRAUD S, BON C, WISNER A. 2000. Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochimie.* 82: 851-859.

CAHUANA G. 1996. Características de un enzima coagulante aislada del veneno de la serpiente *Bothrops bilineatus* “Loro Machaco” y su comparación con una coagulasa bacteriana. Tesis para optar al título Profesional de Biólogo con Mención en Microbiología y Parasitología. UNMSM Lima Perú.

CAMEY KU, VELARDE DT, SANCHEZ, EF, 2002. Pharmacological characterization and neutralization of the venoms used in the production of Bothropic antivenom in Brazil. *Toxicon* 40, 501–509.

CARRILLO N, ICOCHEA J. 1995. Lista taxonómica de los reptiles vivientes del Perú. Publicaciones del Museo de Historia Natural, UNMSM. Serie A, N° 49, 27 pp.

CASTRO HC, SILVA DM, CRAIK C, ZINGALI RB. 2001. Structural features of a snake venom thrombin-like enzyme: thrombin and trypsin on a single catalytic platform? *Biochim. Biophys. Acta* 1547, 183–195.

CASTRO HC, ZINGALI RB, ALBUQUERQUE MG, PUJOL-LUZ M, RODRIGUES CR. 2004. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. *Cell Mol. Life Sci.* 61: 843–856.

CHIPPAUX J, WILLIAMS V, WHITE J. 1991. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon.* 29: 1279-1303.

COPLEY A. 1973. Studies of snake venoms on the blood coagulation. The thromboserpentin enzyme in the venoms. *Thrombos. Res.* 2: 487-508.

COSTA FL, RODRIGUES RS, IZIDORO LF, MENALDO DL, HAMAGUCHI A, HOMSI-BRANDEBURGO MI, FULY AL, SOARES SG, SELISTRE-DE-ARAÚJO HS, BARRAVIERA B, SOARES AM, RODRIGUES VM. 2009. Biochemical and functional properties of a thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Toxicon.* 54(6):725-35.

COSTA JDE O, FONSECA KC, MAMEDE CC, BELETTI ME, SANTOS-FILHO NA, SOARES AM, ARANTES EC, HIRAYAMA SN, SELISTRE-DE-ARAÚJO HS, FONSECA F, HENRIQUE-SILVA F, PENHA-SILVA N, DE OLIVEIRA F. BHALTERNIN: 2010. Functional and structural characterization of a new thrombin-like enzyme from *Bothrops alternatus* snake venom *Toxicon.* 15; 55(7):1365-1377.

DESHIMARU M, OGAWA T, NAKASHIMA K, NOBUHISA I, CHIJIWA T, SHIMOHIGASHI Y, FUKUMAKI Y, NIWA M, YAMASHINA I, HATTORI S, OHNO M. 1996. Accelerated evolution of crotalinae snake venom gland serine proteases. *FEBS Lett.* 397, 83–88.

DENSON KWE, RUSSELL FE, ALMARGO D, BISHOP RC. 1972. Characterization of the coagulant activity of some snake venoms. *Toxicon* 10: 557-562.

DOLEY R, MACKESSY SP, KINI RM. 2009. Role of accelerated segment switch in exons to alter targeting (ASSET) in the molecular evolution of snake venom proteins. *BMC Evol. Biol.* 9, 146.

EDMAN P, BEGG G. 1967. A protein sequenator. *Eur J Biochem.* 1(1):80-91

ERLANGER B, KOKOWSKY N, COHEN W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Arch Biochem Biophys. 95: 271-278.

ESNOUF MP, TUNNAH GW. 1967. The isolation and properties of the thrombin-like activity from *Agkistrodon rhodostoma* venom. Br J Haematol., 13(4):581-90.

EWART MR, HATTON MWC, BASFORD JM, DODGSON KS. 1970. The proteolytic action of Arvin on human fibrinogen. Biochem J 118: 603–9.

FARES F. 2006. The role of O-linked and N-linked oligosaccharides on the structure-function of glycoprotein hormones: development of agonists and antagonists. Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj. 1760 (4), 560–567.

FARID TM, TU A, EL ASMAR M. 1989. Characterization of cerastobin, a thrombin-like enzyme from the venom of *Cerastes vipera* (Shara sand viper). Biochemistry 28: 371-377.

FRY, B. 2005. From genome to “venome”: Molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. Genome Res. 15: 403-420.

FUNK C, GMUR J, HEROLD R, STRAUB PW. 1971. Reptilase-R: A new reagent in blood coagulation. Br. J Haemachatos. 21: 43.

HALL, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.

HELENIUS A, AEBI M. 2001. Intracellular functions of N-linked glycans. Science 291 (5512), 2364–2369.

HELENIUS A, AEBI M. 2004. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. Annu. Rev. Biochem. 73, 1019–1049.

IMPERIALI B, O'CONNOR SE. 1999. Effect of N-linked glycosylation on glycopeptide and glycoprotein structure. Curr Opin Chem Biol. 3(6):643-9.

INGA R., 2010. Caracterización Estructural, Biológica y Molecular de una Isoenzima básica de fosfolipasa A2 del veneno de la serpiente peruana *Lachesis muta* (Linnaeus, 1766). Tesis para optar al Grado de Magíster en Biología Molecular. UNMSM. Lima-Perú.

Instituto Cloromido Picado. 2007. Determinación de actividades tóxicas de venenos de serpientes y su neutralización por antivenenos. Manual de Laboratorio. Facultad de Microbiología. Universidad de Costa Rica. Pág.21-22.

ITOH N, TANAKA N, MIHASHI S, YAMASHINA I. 1987. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme. J. Biol. Chem. 262, 3132–3135.

ITOH N, TANAKA N, FUNAKOSHI I, KAWASAKI T, MIHASHI S, YAMASHINA I. 1988. Organization of the gene for batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme. Homology with the trypsin/ kallikrein gene family. J. Biol. Chem. 263: 7628– 7631.

JIMENEZ, K., 2009. Clonaje y Caracterización Molecular In silico del gen de Fosfolipasa A2 aislado del veneno de la serpiente peruana *Lachesis muta*. Tesis para optar al Grado de Magíster en Biotecnología. UNMSM. Lima-Perú.

KAMAGUTI A, CARDOSO J. 1989. Haemostatic changes caused by the venoms of South American Snakes. Toxicon 27(9): 955-963.

KINI R. 2005. Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake venoms. Pathophysiol. Haemost. Thromb. 34:200–204.

KINJOH K, KOSUGI T, NAKAMURA M, HANASHIRO K, SUNAGAWA M, TOKESHI Y. 1997. Habutobin split the Arg16-Gly17 bond in the Aa chain of rabbit fibrinogen. Thromb. Haemostasis 77: 1127–1128.

KOH Y, CHUNG K, KIM S. 2001. Biochemical characterization of a thrombin-like enzyme and a fibrinolytic serine protease from snake (*Agkistrodon saxatilis*) venom. Toxicon 39(4): 555–560.

KOH DC, ARMUGAM A, JEYASEELAN K. 2006. Snake venom components and their applications in biomedicine. Cell Mol Life Sci; 63(24):3030-41.

KREM M. M., ROSE T. AND DI CERA E. 2000. Sequence determinants of function and evolution in serine proteases. Trends Cardiovasc. Med. 10: 171–176

LAEMMLI UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.

- LARABA-DJEBARI F, MARTIN-EAUCCLAIRE MF, MARCHOT P. 1992. A fibrinogen-clotting serine proteinase from *Cerastes cerastes* (horned viper) venom with arginine-esterase and amidase activities. Purification, characterization and kinetic parameter determination. *Toxicon* 30: 1399–1410.
- LEE JW, SEU JH, RHEE, IK, JIN I, KAWAMURA Y, PARK W. 1999. Purification and characterization of brevinase, a heterogeneous two-chain fibrinolytic enzyme from the venom of Korean snake, *Agkistrodon blomhoffii brevicaudus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260, 665–670.
- LEHNINGER A, NELSON D, COX M. 2001. Principios de Bioquímica. Ediciones Omega 4ta edición.
- LIMAN, J. 1996. Purificación y Caracterización parcial de la enzima similar a trombina del veneno de *Bothrops brazili*. Tesis para optar al título profesional de Biólogo con mención en Genética. UNMSM. Lima – Perú.
- LIN Y, YU X, HE Q, LI H, LI D, SONG X, WANG Y, WEN H, DENG H, DENG J. 2009. Expression and functional characterization of chitribrisin, a thrombin-like enzyme, in the venom of the Chinese green pit viper (*Trimeresurus albolabris*). *Protein Expr Purif.* 67(1):48-52.
- LOCHNIT G, GEYER R.1995. Carbohydrate structure analysis of batroxobin, a thrombin-like serine protease from *Bothrops moojeni* venom. *Europ J Biochem* 228: 805–16.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall, RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol.Chem.* 193, 265–275.
- LUO X, YANG H, LIANG C, JIN S. 2010. Structural characterization of N-linked oligosaccharides of Defibrase from *Agkistrodon acutus* by sequential exoglycosidase digestion and MALDI-TOF mass spectrometry. *Toxicon.* 55(2-3):421-429.
- MAGALHAES A, FERREIRA R, RICHARDSON M, GONTIJO S, YARLEQUE A, MAGALHAES H, BLOCH C. SANCHEZ E. 2003. Coagulant thrombin-like enzymes from the venoms of Brazilian and Peruvian bushmaster (*Lachesis muta muta*) snakes. *Comp Biochem Physiol B.* 136: 255-266.

- MAGALHÃES A, MAGALHÃES H, RICHARDSON M, GONTIJO S, FERREIRA N, ALMEIDA A, SANCHEZ E. 2007. Purification and properties of a coagulant thrombin-like enzyme from the venom of *Bothrops leucurus*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 146(4):565-75.
- MARKLAND, F.S. 1998. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon* 36, 1749–1800.
- MATTOCK P, ESNOUF MP. 1971. Differences in the subunit structure of human fibrin formed by the action of Arvin, Reptilase and thrombin. *Nature* 1971; 223: 277–9.
- MESIA M. 1996. Purificación y caracterización bioquímica de la enzima similar a Trombina del veneno de la serpiente *Bothrops pictus* “jergón de la costa”. Tesis para optar al título de Biólogo con Mención en Microbiología y Parasitología. Facultad de Ciencias Biológicas. UNMSM. Lima – Perú.
- MITCHELL S, REICHERT E. 1883. Preliminary report on the venoms of serpents. *Med. News (Philad.)* 42: 469.
- MURUYAMA N, SAGUCHI K, MENTELE R, ASSAKURA M, OHI H, FUJITA Y, CAMARGO A, HIGUCHI S, SERRANO S. 2003. The unusual high molecular mass of *Bothrops* protease A, a trypsin-like serine peptidase from the venom of *Bothrops jararaca*, is due to its high carbohydrate content. *Biochim. Biophys. Acta* 1652: 1–6.
- NOC F. 1904. Sur quelques proprietes physiologiques des différent venins de serpents. *Ann. Inst. Pasteur* 18: 387-406.
- NORRIS G, STILLMAN T, ANDERSON B. BAKER E, 1994. The three-dimensional structure of PNGase F, a glycosyl asparaginase from *Flavobacterium meningosepticum* *Structure* 2(11): 1049-1059.
- OUCHTERLONY O, NILSSON L. 1967. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. *Handbook of Experimental Immunology*. 1(34): 655-660.
- OUYANG C, TENG C, HUANG T. 1992. Characterization of snake venoms components acting on blood coagulation and platelet function. *Toxicon* 30(9): 945-966.
- OYAMA E, TAKAHASHI H. 2000. Purification and characterization of a thrombin-like enzyme, elegaxobin, from the venom of *Trimeresurus elegans* (Sakishima-habu). *Toxicon* 38(8): 1087-1100.

OYAMA E, TAKAHASHI H. 2002. Amino acid sequence of a thrombin like enzyme, elegaxobin, from the venom of *Trimeresurus elegans* (Sakishima-habu). *Toxicon* 40: 959–970.

PETRETSKI J, KANASHIRO M, SILVA C, ALVES E, KIPNIS T, 2000. Two related thrombin-like enzymes present in *Bothrops atrox* venom. *Braz J Med Biol Res.*33 (11):1293-300.

PHISALIX C. 1899. Venin et coagula bilité du sang chez in vipere C.R. Soc. Biol. (Paris) 51, 834-837.

PIRKLE H, MARKLAND FS, THEODOR I, BAUMGARTNER R, BAJWA SS, KIRAKOSSIAN H. 1981. The primary structure of crotalase, a thrombin-like venom enzyme, exhibits closer homology to kallikrein than to other serine proteases. *Biochem Biophys Res Commun* 99: 715–21.

PIRKLE H, VUKASIN P, THEODOR I. 1988. Thrombin-like enzymes in the study of fibrin formation. In: *Hemostasis and Animal Venoms*, pp. 121–141, Pirkle H. and Markland F. S. (eds), Marcel Dekker, NewYork.

PIRKLE, H. 1998. Thrombin-like enzymes from snake Venoms: An updated inventory. *Thromb. haemost.* 79: 675-683.

PITNEY WR, BELL WR, BOLTON G. 1969. Blood fibrinolytic activity during Arvin therapy. *Br J Haematol*; 16: 165–71.

PONCE-SOTO L, BONFIM V, NOVELLO J, NAVARRO R, YARLEQUÉ A. MARANGONI S. 2007. Isolation and Characterization of a Serine Protease, Ba III-4, from Peruvian *Bothrops atrox* venom. *The Protein Journal*, Vol. 26 (6): 387-394.

ROJNUCKARIN P, MUANPASITPORN C, CHANHOM L, ARPIJUNTARANGKON J, INTRAGUMTORNCHAI T. 2006. Molecular cloning of novel serine proteases and phospholipases A2 from green pit viper (*Trimeresurus albolabris*) venom gland cDNA library. *Toxicon*. 47(3):279-87. Epub 2005 Dec 20.

SAGUCHI K, HAGIWARA-SAGUCHI Y, MURAYAMA N, OHI H, FUJITA Y, CAMARGO AC, SERRANO SM, HIGUCHI S. 2005. Molecular cloning of serine proteinases from *Bothrops jararaca* venom gland. *Toxicon*. 46(1):72-83.

SANDOVAL G, LAZO F, RODRIGUEZ E, YARLQUE A, ZINGALI R. 2010. Identificación molecular y actividad sobre sustratos cromogénicos de la venombina A del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox*. Rev. peru. biol. 17(3): 365 – 370.

SANT'ANA CD, BERNARDES CP, IZIDORO LF, MAZZI MV, SOARES SG, FULY AL, ZINGALI RB, MAGRO AJ, BRAZ AS, FONTES MR, STÁBELI RG, SAMPAIO SV, SOARES AM. 2008. Molecular characterization of BjussuSP-I, a new thrombin-like enzyme with procoagulant and kallikrein-like activity isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. Biochimie. 90(3):500-507.

SATOMI Y, SHIMONISHI Y, TAKAO T. 2004. N-glycosylation at Asn(491) in the Asn-Xaa-Cys motif of human transferrin. FEBS Lett. 8;576(1-2):51-6.

SCHMERT G, TAKENAKA Y. 1955. A spectrophotometric determination of tripsyn and chymotrypsin. Biochem . Biophys Acta 16, 570.

SERRANO SMT, MAROUN RC. 2005. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. Toxicon 45, 1115–1132.

SILVA FP JR, DE-SIMONE SG.2004. S1 subsite in snake venom thrombin-like enzymes: can S1 subsite lipophilicity be used to sort binding affinities of trypsin-like enzymes to small-molecule inhibitors? Bioorg Med Chem. 15;12(10):2571-87.

SILVA-JUNIOR F, GUEDES H, GARVEY C, AGUIAR A, BOURGUIGNON S, DI CERA E, GIOVANNI-DE-SIMONE S. 2007. BJ-48, a novel thrombin-like enzyme from the *Bothrops jararacussu* venom with high selectivity for Arg over Lys in P1: Role of N-glycosylation in thermostability and active site accessibility. Toxicon 50(1): 18-31.

STOCKER K, FISHER H, MEYER J. 1982. Thrombin-like snake venom proteinases. Toxicon. 20(1): 265-273.

STOCKER KF, MEIER J. 1988. Thrombin- like snake venom enzymes. In: Hemostasis and Animal Venoms. Vol. 7, pp. 67- 84 (Pirkle, H., Markland, F. S., Eds). New York; Marcel Dekker Inc.

STOCKER K. 1990. Medical Use of Snake Venoms Protein. CRC Press, Boca Raton, FL.

STUBBS MT, BODE W. 1993. A player of many parts: the spotlight falls on thrombin's structure. Thromb Res. 1; 69(1):1-58.

SVENDSEN, L. 1977. Aktivitätsbestimmung proteolytischen enzyme mit synthetischen substanzen (Activity determination of proteolytic enzyme with synthetic substances). Chromogene substrate in der Gerinnungsanalytik, Aktuelle Diagnostik, Boehringer Mannheim. Pp 14-17.

TURPIE AGG, PRENTICE CRM, MCNICOL GP, DOUGLAS AS .1971. In-vitro studies with ancrod (Arvin). Br J Haematol; 20: 217–24.

VANCE BA, WU W, RIBAUDO RK, SEGAL DM, KEARSE KP. 1997. Multiple dimeric forms of human CD69 result from differential addition of N-glycans to typical (Asn-X-Ser/Thr) and atypical (Asn-X-Cys) glycosylation motifs. J Biol Chem. 12;272(37):23117-22.

VIVAS D, INGA R, MENDOZA J, LAZO F, YARLEQUÉ A. 2010. Barnetobina, un nuevo principio coagulante purificado del veneno de la serpiente peruana *Bothrops barnetti*. Rev. Soc. Quim. Perú 76(3).

WARBURG O, CHRISTIAN W. 1941. Isolierung and Kristallisation des Gärungsferments Enolase. Biochem. 2(130): 384-421.

WARREN L. 1959. The thiobarbituric acid assay of sialic acids. J Biol Chem; 234(8):1971-5.

WINZLER R. 1955. Determinations of serum glycoproteins. En: Methods of Biochemical Analysis. 2: 279-311

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1981. Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenom. Geneva: Worl Health Organization.

YARLEQUÉ A, CAMPOS S, ESCOBAR E, LAZO F, SANCHEZ N, HYSLOP S, MARSH NA. BUTTERWORTH PJ, PRICE RG. 1989. Isolation and characterization of a Fibrinogen-clotting enzyme from venom of the snake *Lachesis muta muta* (Peruvian bushmaster). Toxicon, 27(11): 1189-1197.

YARLEQUÉ A. 1987. Enzima similar a trombina del veneno de la serpiente *Lachesis muta*: Aislamiento, caracterización bioquímica y acción biológica. Tesis Doctoral UNMSM, Lima Perú.

ZAVALETA A, SALAS M. 1996. Ofidismo: envenenamiento por mordeduras de serpientes. En: Martinez-Villaverde, J.R., León-Barúa, E., Vidal- Neira, L., Losno-Garcia, R. (Eds), Emergencias en medicina interna. Lima Perú, pp 241-260.

ZHU Z, LIANG T, ZHANG Z, ZHU W, XU M, TENG L, NIU C. 2005. Structures and amidolytic activities of two glycosylated snake venom serine proteinases, J. Biol. Chem. 280 10524e10529.

ANEXOS

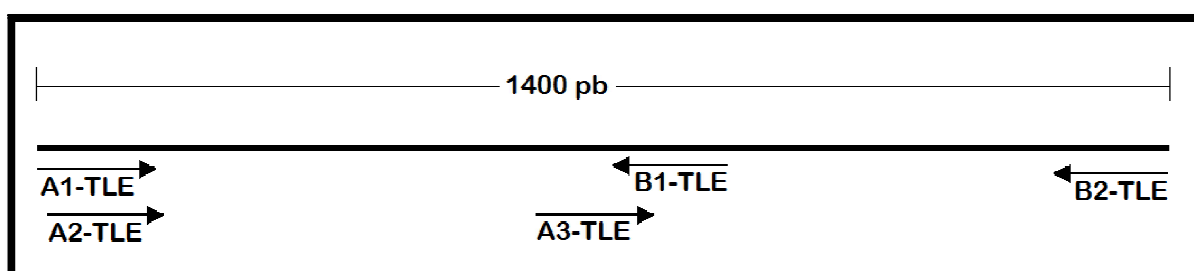
ANEXO 1

Set de iniciadores diseñados para la amplificación del gen específico para la barnetobina

Primer	Secuencia 5'-3'	Tm (1M Na+)	Tm (50mM Na+)	% GC
A1 TLE	AGAAGTCTCCGCTTGGGT	79.00	57.00	56
A2 TLE	ATGGTGCTGATCAGAGTG	74.00	52.00	50
A3 TLE	CATGTGGGGGTGACTCTG	80.00	58.00	61
B1 TLE	CTGCAATAATGCTCTGGA	75.00	53.00	44
B2 TLE	ATTGCTGTGGATACCTGA	74.00	52.00	44

ANEXO 2

Esquema del posicionamiento en el cDNA de los cebadores diseñados para la amplificación de la enzima similar a trombina de *Bothrops barnetti*.



La distancia entre el inicio de A1-TLE y A2-TLE es de 50 pb, elaborados de esta manera para poder abarcar la secuencia del péptido señal. La distancia entre A1-TLE y B1-TLE es de aproximadamente 760 pb la cual cubriría la primera mitad de el gen TLE: Thrombin like enzyme.

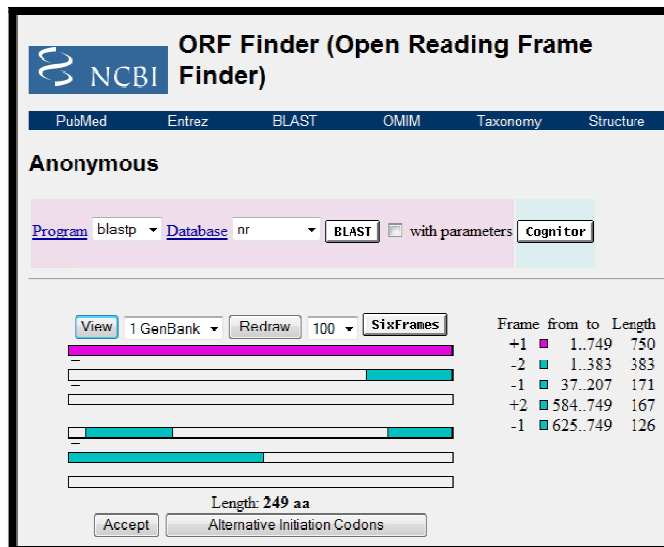
ANEXO 3

Tabla de Alineamiento de la secuencia nucleotídica de la barnetobina

Acceso	Descripción	Max score	Score total	Query coverage	E value	Max ident
AF490536.1	<i>Bothrops insularis</i> cluster BITS01A serine proteinase precursor, mRNA.	1018	1018	98%	0.0	92%
JQ2684.1	Snake (<i>Bothrops atrox</i>) batroxobin mRNA encoding a serine protease	859	859	98%	0.0	88%
AY618559.1	<i>Bothrops alternatus</i> serine proteinase BthaTI precursor Mrna	723	723	92%	0.0	86%
AB031394.1	<i>Bothrops jararaca</i> mRNA for proteasa A	695	695	97%	0.0	84%
AF395776.1	<i>Trimeresurus stejnegeri</i> serine protease KN12 precursor, mRNA	628	628	97%	1e-176	82%
EF690366.1	<i>Cryptelytrops albolabris</i> thrombin-like serine protease 2 mRNA	606	606	97%	5e-170	82%
HQ414117.1	<i>Crotalus adamanteus</i> serine proteinase 1mRNA	577	577	97%	4e-161	81%
GU570567.1	<i>Macrovipera lebetina</i> serine protease VLSP-precursor mRNA	568	568	97%	3e-158	81%
AF444251.1	<i>Gloydus usseriensis</i> thrombin-like enzyme ussurase mRNA	566	566	92%	9e-158	82%
DQ247723.1	<i>Lachesis sternophys</i> serine protease mRNA	549	549	96%	9e-153	81%

ANEXO 4

Marcos de lectura abierta posibles para el cDNA de la barnetobina.



En color lila se muestra el tamaño del fragmento de aminoácidos deducida que fue seleccionado para este estudio

ANEXO 5

Secuencia de aminoácidos deducidos del cDNA de la barnetobina empleando los 6 marcos de lectura mediante el empleo del programa *Tranlate Tool*.

Translate Tool - Results of translation

Please select one of the following frames:

5'3' Frame 1
APKELQVSYAHKSSSELVIGGDECDINEKTFALFLYSRGNFCGLTLINQEWVLTAAHCDRRF MetPIYLGHTLSVPNDDEVIRYPKD
NFICPNNNIIDEKDKDIMetLIRLNRPVKNSEHIAPISLPNLPVSGSVCRV MetGWGSITAPNDTFPDVPHCANINLFNDTVCHGAY
KRFPVKSRITLCAGVLQGGKDKCMetGDSGGPLICNGPFHGLFWGDDPCALPRKPALYTKGFEYPPWIIQSIIAKNTTETCPP Stop

5'3' Frame 2
PQRNYRFHTHTSHLNWSLEV MetNVT Stop MetKKLSLHSC TLAGISVV Stop L Stop STRNGC Stop PLHTVTGDLCPYTLVYIP Stop VYQ
Met Met Met R Stop Stop DTQRIISFYPIII Stop LTKRTRTLC Stop SG Stop TDLSKTVNTSPLSVCLPTFPVWQFAVLWDGAQSQLLTLF
P Met SLIVLTLTCS Met IRCV Met ELTKGFR Stop KAEHC VQVSCKEAKIN VWETLGDPSA Met DHFTAFYFGE Met IPVPCRVS LPS
PRALNIPPGSRALLQKIQRLAPR

5'3' Frame 3
PKGITGFIQTQVI Stop TGHWR Stop Stop Met Stop HK Stop KNFPCIPVLSREFLWDFDQPG Met GADRCTL Stop OEIYAHIPWYTYPKCT
K Stop Stop Stop GDKIPKG Stop FHLSQ Stop Stop YN Stop RKGQGHYVDQAEQTCQKQ Stop THRPYQFAFQPSQGLSLPCYG Met GLNH
SS Stop RHFSRCPSLC Stop H Stop PVQ Stop YGVSWSLQKVS GEKQNIVCRCPARRQR Stop Met YGRLWGTPLHQTISRHFILGR
Stop SLCPAA Stop ACPLHQGL Stop I SPLDPEHYCKKYN Stop DLPV

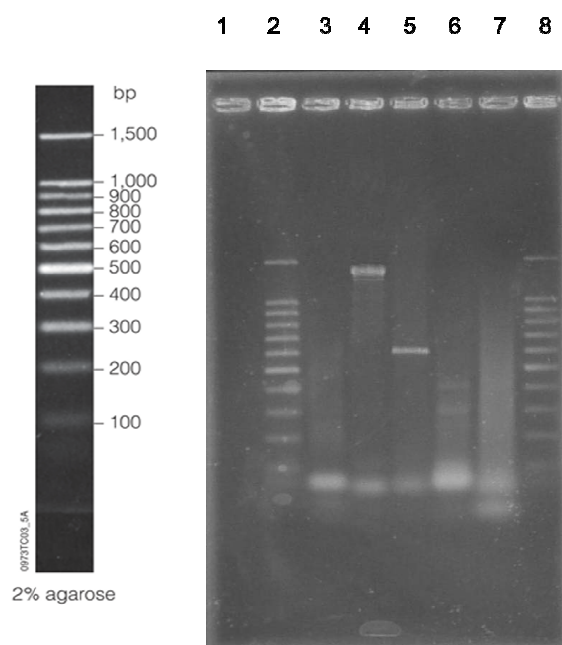
3'5' Frame 1
SRCASLSGIFCENNALDPCCIFKALCVEGRLTRQCTCIISPK Stop NAVKWSIADECS PRVSHTFIFASLQDTCTQCSAFHRKPFVS
S Met THRIIEQVNVST Met RDIGKSVVRS CD Stop APSHTAN Stop AHTGKVGRQTD RGDVFTVFDRSVQPD OHNVLVLFVNYIIIGTN
EILWVSYHLIIWYT Stop G Met YTKVYGHKSPVTVCSGQHPLVDQSQTEIPARVQECKESFFIYVTFITSNDQFR Stop LVCV Stop N
L Stop FLWG

3'5' Frame 2
HGGQVSVVFFAI Met LWIQGGYSKPLV Stop RAGLRGHAQGSSPQNK Met P Stop NGPLQ Met RGPPESPIHLSLPPCRI PAHNVLLFI
GNLL Stop AP Stop HTVSLNRL Met LAQ Stop GTS GKVS LGAVIEHPITRQTEPTLGRLEGKLIAMetCSLFTGLFSLINI Met SLFS
IILLGQ Met KLSFGYLITSSFGTLRVCI PRY Met GINLLSQCAAVSTHSWLIVKPKQKFPREYRNARKVFSF Met SHSSPP Met TSSD
DLCAYETCNSFG

3'5' Frame 3
TGKKSQLYFLQ Stop CSGSRGDIQSPWCRGQAYAAAGHRDHLPIKICRE Met VHCR Stop GVPQSLPYIYLCLLAGHLHT Met FCFSP
TFCKLHDTPIYH Stop TG Stop C Stop HNEG HREKCR Stop EL Stop LSPIP Stop HGKLSPHWEGWKAN Stop Stop GRCVHCF Stop QVCSA
Stop ST Stop C PCPFRQLYYWDK Stop NYP LGILSPHHHLVHLGYVYQGIWA Stop ISCHSVQRSAPIG Stop SKSNHRNSRESTG Met
QGGFFHLCHIIHLQ Stop PVQ Met TCVR Met KPIVILG

ANEXO 6

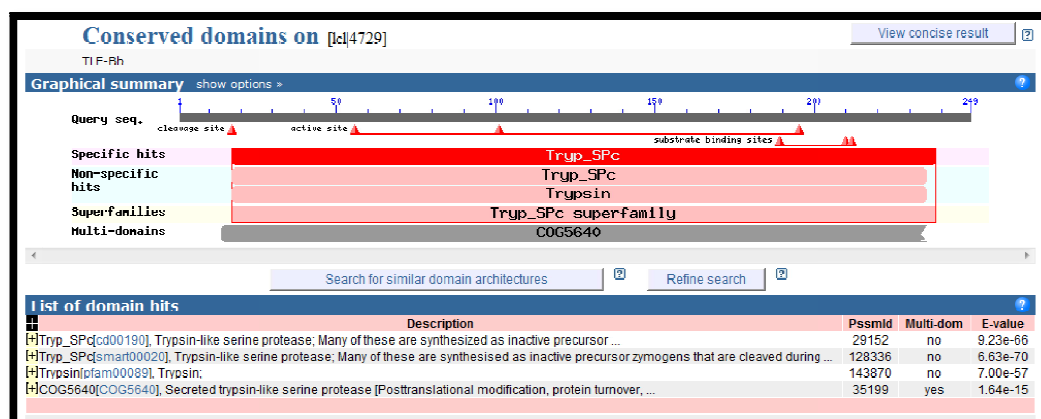
Electroforesis en gel de agarosa al 1,2 % del amplificado del cDNA de la barnetobina



De izquierda a derecha: 1) Control negativo, 2 y 8) Marcadores, 3) Cebadores (A2 EST- B2 EST), 4) Amplificado 1400bp aprox. con los cebadores A2-B2, 5) Amplificado 600bp aprox. con los cebadores A2-B1, 6) Productos inespecíficos al realizar la amplificación con los cebadores A3-B2. 7) Primer (A2EST-B1 EST).

ANEXO 7

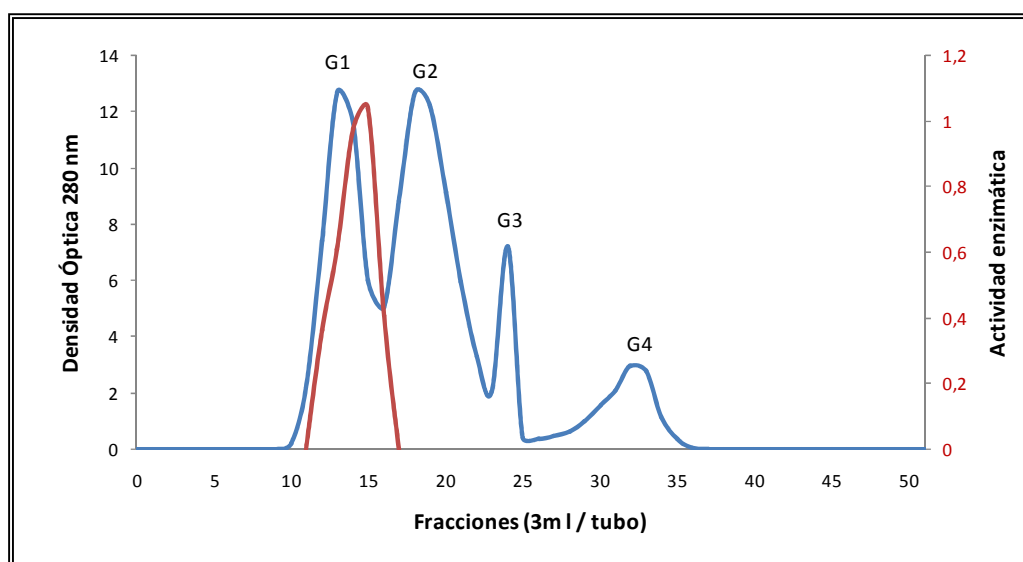
Resultado del análisis de la secuencia aminoacídica deducida para la barnetobina mediante el programa BLASTp.



La proteína pertenece a la superfamilia de proteasas similares a tripsina se muestra la ubicación de los residuos que componen el sitio activo y de unión a sustrato (Flechas rojas).

ANEXO 8

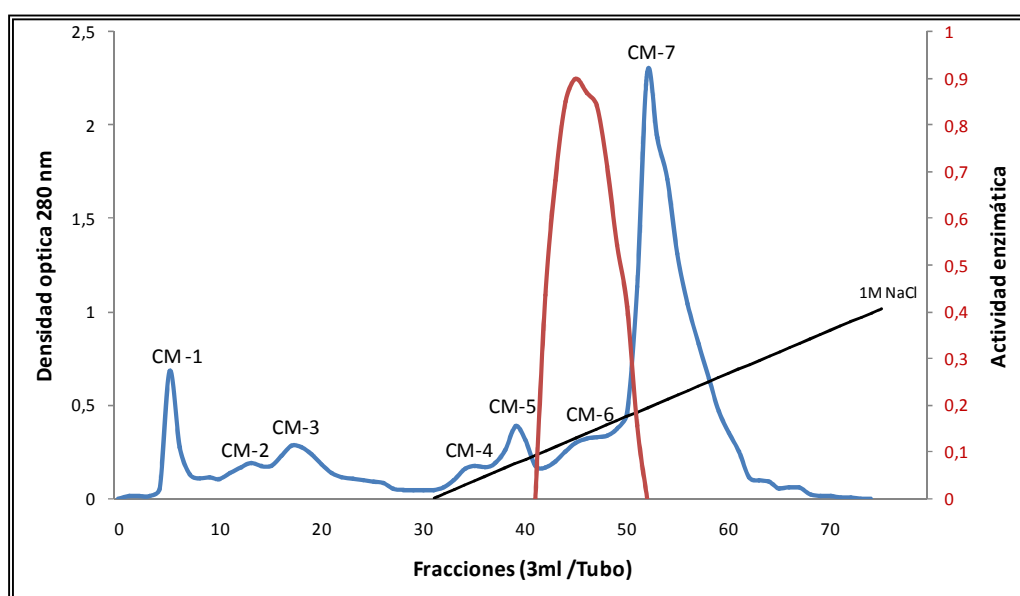
Primer paso de purificación de la barnetobina por cromatografía de filtración molecular usando Sephadex G-100.



La línea azul indica la cantidad de proteína y la línea roja la actividad amidolítica método de Erlanger et al., (1961).

ANEXO 9

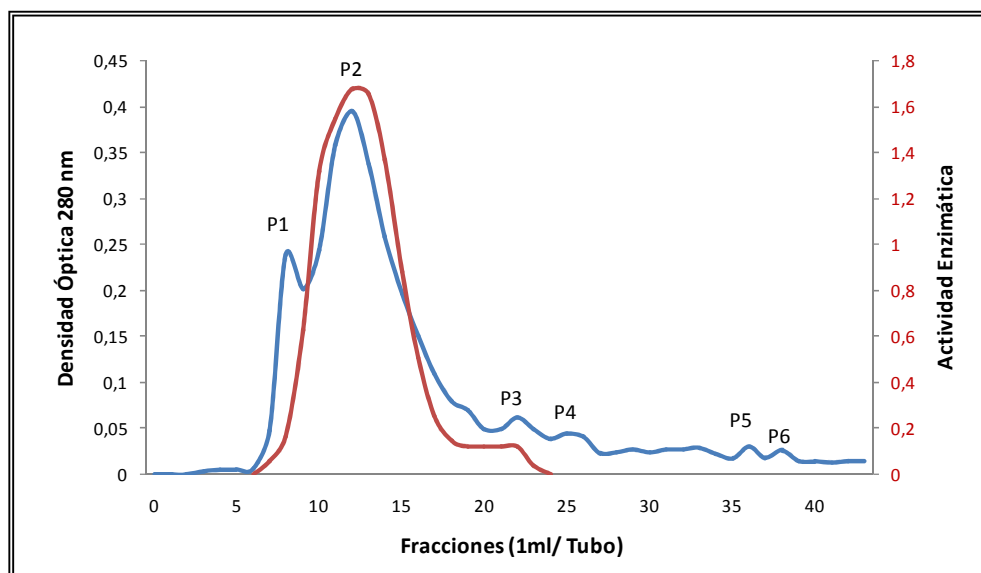
Segundo paso de purificación de la barnetobina por cromatografía de intercambio catiónico usando CM Sephadex C-50.



La línea azul indica la cantidad de proteína y la línea roja la actividad amidolítica método de Erlanger et al., (1961). La línea negra indica la gradiente de NaCl que se emplea para eluir aquellas proteínas que se pegaron iónicamente a la resina.

ANEXO 10.

Tercer paso de purificación de la barnetobina por cromatografía de filtración molecular usando Sephadex G-100



La línea azul indica la cantidad de proteína, la línea roja la actividad amidolítica por el método de Erlanger et al., (1961).

ANEXO 11

Pasos de purificación de la barnetobina del veneno de *Bothrops barnetti*.

Muestra	Proteína		Actividad específica ^a (umol/min/mg)	Unidades totales de Actividad	Rendimiento (%)	Purificación
	Cantidad (mg)	%				
Veneno crudo	292,138	100	0,027	8,078	100	1
Sephadex G-100	105,8	35,267	0,076	8,019	99,2	2,815
CM-Sephadex C-50	6,4	2,139	0,755	4,847	61,01	28
Sephadex G-100	1,791	0,597	1,407	2,519	32,19	52,2

^a Medida sobre el sustrato Benzoil-Arginil-p-Nitroanilida (BAPNA). La actividad se cuantifica por los moles de p-Nitroanilida liberados en un minuto por un miligramo de enzima empleada.

La concentración de proteína fue medida por el método de Lowry et al 1950.